



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 39/395, 38/18, 45/00, A01N 1/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/18487 </p> <p>(43) 国際公開日 1998年5月7日 (07.05.98) </p>									
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/03978</p> <p>(22) 国際出願日 1997年10月31日 (31.10.97)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平8/290459</td> <td>1996年10月31日 (31.10.96)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平8/351718</td> <td>1996年12月27日 (27.12.96)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平9/262521</td> <td>1997年9月26日 (26.09.97)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 持田製薬株式会社 (MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒160 東京都新宿区四谷1丁目7番地 Tokyo, (JP) 財団法人 大阪バイオサイエンス研究所 (OSAKA BIOSCIENCE INSTITUTE)[JP/JP] 〒565 大阪府吹田市古江台6丁目2番4号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ)</p> <p>長田重一(NAGATA, Shigekazu)[JP/JP] 〒565 大阪府吹田市佐井寺2丁目21-17-511 Osaka, (JP) 矢富丈博(YATOMI, Takehiro)[JP/JP] 〒160 東京都新宿区四谷1丁目7番地 持田製薬株式会社内 Tokyo, (JP)</p>		特願平8/290459	1996年10月31日 (31.10.96)	JP	特願平8/351718	1996年12月27日 (27.12.96)	JP	特願平9/262521	1997年9月26日 (26.09.97)	JP	<p>須田貴司(SUDA, Takashi)[JP/JP] 〒562 大阪府箕面市小野原東3丁目4-20-302 Osaka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 渡辺望稔, 外(WATANABE, Mochitoshi et al.) 〒101 東京都千代田区岩本町3丁目2番2号 千代田岩本ビル4階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, NO, NZ, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平8/290459	1996年10月31日 (31.10.96)	JP									
特願平8/351718	1996年12月27日 (27.12.96)	JP									
特願平9/262521	1997年9月26日 (26.09.97)	JP									
<p>(54)Title: PROPHYLACTIC/REMEDIAL AGENT</p> <p>(54)発明の名称 予防・治療剤</p> <p>(57) Abstract A prophylactic/remedial agent or apoptosis inhibitor for diseases presumable to be attributable to apoptosis and an organ preservative, each containing a Fas antagonist as the active ingredient.</p>											

(57) 要約

本発明はアポトーシスの関与が示唆される疾患の予防および治療を目的とし、
Fas アンタゴニストを有効成分とする疾患の予防・治療剤又は細胞アポトーシ
ス抑制剤および臓器保存剤に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GB	イギリス	MC	モナコ	TD	チャド
AZ	アゼルバイジャン	GE	ジョージア	MD	モルドバ	TG	タンザニア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バハマ	GM	ギニア	MK	マケドニア共和国	TR	トルコ
BE	ベルギー	GN	ギニア			TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	UA	ウクライナ
BJ	ベナン	GU	グアテマラ	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
BR	ブラジル	DE	ドイツ	MR	モーリタニア	US	米国
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CA	カナダ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ベトナム
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	WU	ウイグル
CH	スイス	IT	イタリア	NN	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	JP	日本	NL	オランダ		
CM	カメルーン	KE	ケニア	NO	ノルウェー		
CN	中国	KR	韓国	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギス	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	LR	リベリア	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	LL	リベリア	RS	セルビア		
DK	デンマーク	LI	スイス	SE	スウェーデン		
EE	エストニア			SI	スロベニア		

明細書

予防・治療剤

5 技術分野

本発明はF a s アンタゴニストを有効成分とする疾患の予防・治療剤又は細胞アポトーシス抑制剤および臓器保存剤に関する。

背景技術

- 10 F a s は、ヒト線維芽細胞でマウスを免疫して得られたモノクローナル抗体であるF a s 抗体（ヨネハラ S.(Yonehara S.) 等、J. Exp. Med.、169 巻、1747-1756 頁、1989 年）によって認識され、アポトーシスのシグナルを細胞に伝達する細胞表面抗原である。最近、イトウ N.(Itoh N.) 等によって、F a s 遺伝子がクローニングされ、F a s が約45 k Dの細胞膜上の蛋白質であり、そのアミノ酸配列から TNFレセプターファミリーに属する事が判明
- 15 した（Cell、66巻、233-243 頁、1991年）。また、マウスF a s 遺伝子もクローニングされ（ワタナベフクナガ(Watanabe-Fukunaga R.)等、J. Immunol., 148 巻、1274-1279 頁、1992年）、F a s mRNAが、マウスの胸腺、肝、肺、心臓、卵巣で発現していることが確認された。
- 20 ヒトF a s リガンドは、F a s を発現する細胞に対してアポトーシスを誘導する生体内分子として、長田等により報告されたポリペプチドである（Tomohiro Takahashi 等、International

Immunology、6巻、1567-1574頁、1994年)。ヒトFasリガンドは、TNFファミリーに属する分子量約40kDのII型膜蛋白質で、TNFと同様に、生体内で3量体を形成すると考えられている(Masato Tanaka等、EMBO Journal、14巻、51129-1135頁、1995年)。また、ヒトFasリガンドはラットFasリガンド(Takashi Suda等、Cell、75巻、1169-1178頁、1993年)やマウスFasリガンド(Tomohiro Takahashi等、Cell、76巻、969-976頁、1994年)と細胞外領域において高いホモロジーを有しており、ヒトFasリガンドはヒトFasのみでなくマウスFasをも認識し、アポトーシスを誘導することができる。逆に、ラットFasリガンド及びマウスFasリガンドも、ヒトFasを認識してアポトーシスを誘導することができる。

また、Fasを介するアポトーシスの細胞内シグナル伝達の機序に関しても研究が進んでおり、Fasの細胞内領域、特にデスドメイン(Death domain)と呼ばれる領域と相互作用して、シグナルを伝達または抑制する因子の同定及びクローニングが報告されている他、インターロイキン-1変換酵素(ICE)関連チオールプロテアーゼがFasを介するアポトーシスのシグナル伝達に寄与している可能性が示唆されている。

近年、アポトーシス、特にFasを介するアポトーシスと種々の疾患及び生理的現象との関連が示唆されている。例えば、エイズ患者におけるTリンパ球の減少、ウイルス性劇症肝炎における肝細胞死及びある種の自己免疫疾患等において、Fasを介するアポトーシスの異常が関与する可能性が示唆されてい

る。

また、Fas/Fasリガンド系はアポトーシス以外の機能、例えば、好中球に作用して起炎症性に働く作用等も担っている可能性が示唆されている（カヤギキ N. 等、臨床免疫 28 巻、667-675 頁、1996 年）。

- 5 ところで、種々の刺激、例えばエンドトキシン、又は侵襲により、好中球を初めとする免疫担当細胞が活性化され、サイトカインなど液性因子が血液中、組織中に放出された結果、全身性の炎症反応を起こしている状態は全身性炎症反応症候群（Systemic inflammatory response syndrome：以下、SIRSと略す）と呼ばれる。SIRSにおいては、
- 10 種々の臓器障害を伴う場合が多く、臓器障害が重篤な場合には多臓器機能不全症候群（MODS）に移行する場合もある（若林ら、臨床検査、38巻、349-352頁、1994年）。臓器が障害を受ける過程には、種々の要因が関与するとされるが、侵襲に際して局所で産生されたIL-1などによりマクロファージなどの細胞から産生されるIL-8の作用による好中球の浸潤、集積が重要な役割を果たすといわれており、最近注目を集めている。また、上述したように
- 15 Fas/Fasリガンド系（以下、Fas/FasL系と称す）も好中球の活性化に関与する可能性が報告されている。

- 虚血再灌流障害は、ほとんどすべての組織あるいは臓器において認められ、種々の疾患に関与している。また、臓器保存時やその移植の際にも問題となる。とりわけ、肝臓、心臓または腎臓における梗塞、外科手術または移植などに
- 20 伴う虚血再灌流障害のうち、各臓器における組織障害（例えば細胞壊死など）、および、各臓器における機能障害（例えば心臓における不整脈など）は、重篤な

場合には個体を死に至らしめるものであり、社会的に大きな問題となっている。

種々の臓器障害または虚血再灌流障害においては、IL-8は、早期から晩期にわたって産生・分泌されることが知られている。また、臓器移植時等における臓器保存時及び再灌流時ではアポトーシスが起きていることが知られている。

5 らに、いくつかの実験モデルにおいてアポトーシスが観察されること及びFas又はFasLの発現が変動することが報告されている。また、肝虚血再灌流24時間後に好中球が著しく増加し、好中球の中和抗体が虚血再灌流障害を改善すること（ジェシケ，エイチ．等（Jaeschke, H. et al.），FASEB Journal、4巻、3355-3359頁、1990年）、お

10 よび、肺虚血再灌流3時間後にIL-8、好中球およびマクロファージが著しく増加し、IL-8の中和抗体が、虚血再灌流障害を改善することが報告されている（セキド，エヌ．等（Sekido, N. et al.），Nature、365巻、654-657頁、1993年）。以上のような事実から、好中球およびIL-8は、臓器障害および虚血再灌流障害の早期から晩期にわたって、重要

15 な役割を果たしていることが示唆される。一方、Fas/FasLが、これらの障害において、どのように関与しているかについては明らかでない。

細菌感染における内毒素（エンドトキシン）は、生体内において種々のサイトカイン産生を誘導し、例えばエンドトキシン血症、敗血症等においてエンドトキシンショックを惹起する他、多様な臓器、例えば肝臓等に障害をもたらす。

20 （Dinarello C. A. 等、J. American Medical Association 269巻、1829頁、1993年）、時に重篤な病態を引き起こす。この過程においても、実験的にアポトーシスが観察されること

及びF a s / F a s L系が何らかの形で関与する可能性が報告されているものの、F a s / F a s L系がこれらの障害においてどのように関与しているかについては明らかでない。

従来、種々の心疾患における心筋細胞死は主に壊死（ネクロシス）によると
5 考えられていたが、アポトーシス、特にF a s を介するアポトーシスが心疾患と何らかの関連を有する可能性が、臨床的に、及び実験的に報告されている。例えば、新生ラット心筋細胞をインビトロで虚血にすると、その際にF a s の発現量が増加すること（T a n a k a M. 等、C i r c. R e s. , 7 5, 4 2 6 - 4 3 3, 1 9 9 4）、並びにI L - 1 がラット血管平滑筋細胞の一酸化窒素
10 （NO）合成を誘導すると共にアポトーシスを誘導すること、NO合成の阻害剤がI L - 1 によるアポトーシスを抑制すること、及びNOはF a s の発現を誘導することからNOは動脈硬化のプラークのリモデリングに関与している可能性（F u k u o K. 等、H y p e r t e n s i o n, 2 7, 8 2 3 - 8 2 6, 1 9 9 6）等が報告されている。また、イヌの心不全モデルにおいて、心筋細胞
15 のアポトーシスがおこること、その際F a s の発現増加がおこること（L a b. I n v e s t. , 7 3, 7 7 1 - 7 8 7, 1 9 9 5）及びラット心筋梗塞モデルにおいて、心筋細胞死の大部分がアポトーシスであり、その際F a s の発現が1 0 0 倍以上に増加することが報告されている（L a b. I n v e s t. , 7 4, 8 6 - 1 0 7, 1 9 9 6）。さらに、福田等は、心筋疾患患者の心筋細胞
20 におけるF a s の発現を検討し、肥大性心筋症ではF a s の発現は認めなかったが、心筋炎及び拡張型心筋症では少なくとも一部の心筋細胞でF a s の発現を認めた（特発性心筋症調査班、平成6年度研究報告、1 5 2 - 1 5 5、

1995)。しかしながら、これらの心疾患においてFasがどのように関与しているかは明らかではなかった。従って、以上の報告では、Fasが心疾患において心筋細胞のアポトーシスを促進しているか、あるいは抑制的に作用するのかについては何らデータもなく、心疾患患者の心筋細胞障害又は心筋細胞死に対してFasが直接関与しているか否かは依然として不明であった。したがって、現在までのところ、Fasを介するアポトーシスを抑制することによる心疾患の治療剤及び治療方法は知られていない。

腎疾患においても、アポトーシスの関与が示唆され、実験的腎虚血再灌流障害モデルでFas mRNAの発現が増加することが報告されている
10 (Hakuno N. 等、Endocrinology 137巻、1938-1948頁、1996年)。しかし、腎疾患において、Fas/FasL系がどのように関係しているかについては明らかではない。

移植片対宿主病（以下、GVHD, graft versus host disease）は、供与者又は移植片由来のリンパ球が宿主の組織抗原に対して移植免疫反応を起こす移植片対宿主反応（GVH反応）に起因する疾患である。不適合性骨髄移植や先天性免疫不全症への骨髄移植等の骨髄移植後に起るGVHD、臓器移植後に起るGVHD、免疫低下した宿主に対する大量輸血等の輸血後に起るGVHD等がある。GVHDは、GVH反応に基づく臓器又は組織の障害を伴い、臨床的には下痢、体重減少及び痩身等の消耗症、皮疹、脾腫及び
15 肝機能障害を含み、組織学的には、骨髄やリンパ組織の崩壊及び腸絨毛の萎縮を
20 含む症状を特徴とする。

種々のGVHDにおける宿主組織構成細胞死は主に壊死（ネクロシス）によ

ると考えられていたが、アポトーシス、特にF a sを介するアポトーシスがGVHDと何らかの関連を有する可能性が、実験的に報告されている。例えば、マウスGVHDモデルにおいて腸、皮膚及び舌の上皮細胞死は主にアポトーシスであることが報告されている（A n i t i C. G i l l i a m等、J. Invest. Dermatol.、107巻、377-383頁、1996年）。F a sを介したアポトーシスの関与についてはF a sリガンドが正常なコントロールマウスの脾リンパ球をドナーとした時と、F a sリガンドの変異マウスであるg l dマウス由来の脾リンパ球をドナーとした場合で生存時間は変わらないが皮膚、肝障害はほとんど起らないことが報告されており（M a t t h e w B. B a r k e r B等、J. Exp. Med.、183巻、2645-2659頁、1996年）、F a sを介したアポトーシスがGVHDに關与する可能性は示唆されているものの、F a sを介したアポトーシスがGVHDの致死に關与するのか否かについては結論がでていない。また、上記報告においては用いられている材料がg l dマウス由来の脾リンパ球であることから、g l dマウス由来脾リンパ球においてF a sリガンド欠損の代替機構としてF a sリガンド以外の他の因子（例えば、パーフォリン、TNFなど）の発現量の変化などがGVHD反応に影響を与えることが推察され、得られた結果が必ずしもF a sリガンド欠損の効果だけではない可能性がある。したがって、F a sを介したアポトーシスがGVHDにどのように關与しているのか、あるいはF a sを介したアポトーシスの特異的抑制物質のGVHD治療薬としての可能性は不明であった。

GVHDの予防、治療薬として、従来サイクロスポリンAなどの非特異的免疫

抑制剤が用いられていたが、非特異的免疫抑制を起こすため感染症などの副作用が問題となっている。現在までのところ、F a s を介するアポトーシスを抑制することによるGVHDの治療剤及び治療方法は知られていない。また、選択的免疫抑制によるGVHDの治療剤及び治療方法は知られていない。

- 5 また、虚血再灌流障害に基づく疾患に関しては、上市されている薬物は、血栓溶解または循環改善を主体とするものであり、障害を直接予防または治療するような薬物は得られていない。エンドトキシン血症及び敗血症に関しても、例えば、ショックに対してはステロイドや蛋白分解酵素阻害剤等が用いられるが、臓器障害を直接予防又は治療するような薬物は現在のところない。臓器障害に基づく疾患に対して用いられている薬物は、対症療法が中心となっており、組織または臓器の障害に基づく疾患を予防または根治的に治療するような薬物は得られていない。また、種々の組織または臓器に対して広く有効な予防・治療薬も得られていない。

- 15 このような現状から、広く種々の組織または臓器において障害に基づく疾患を予防または治療する効果があり、生体内で効果が認められ、ヒトに対する毒性の低い医薬品が望まれているが、これらを満足するものは得られていないのが現状である。

- 20 本発明の目的は、F a s アンタゴニストを含有する、新しい作用機序による疾患予防・治療剤及び臓器保存剤としての医薬、及び治療方法を提供することである。より詳しくは、本発明はF a s アンタゴニストを有効成分とする、F a s の関与する疾患の予防・治療剤、臓器保存剤及び治療方法を提供する。

発明の開示

- 本発明者らは、F a s / F a s リガンド系の機能及びF a s / F a s リガンド系を介するアポトーシスの各種疾患における役割を鋭意研究してきたが、F a s アンタゴニストによって、F a s / F a s リガンド系の作用、特にF a s / F a s リガンド系を介するアポトーシスを抑制することにより種々の疾患モデルにおいて病態を改善すること、例えば、虚血再灌流時の心筋細胞の死、同種骨髄移植に伴うGVHDの発症及びエンドトキシンに惹起される臓器の障害が、F a s を介するアポトーシスを阻害するアンタゴニストにより抑制されることを見出し、本発明を完成した。
- 5 F a s リガンド系を介するアポトーシスを抑制することにより種々の疾患モデルにおいて病態を改善すること、例えば、虚血再灌流時の心筋細胞の死、同種骨髄移植に伴うGVHDの発症及びエンドトキシンに惹起される臓器の障害が、F a s を介するアポトーシスを阻害するアンタゴニストにより抑制されることを見出し、本発明を完成した。
- 10 すなわち、本発明はF a s アンタゴニストを有効成分とする疾患、詳しくはF a s / F a s リガンド系の関与する疾患であり、特にF a s を介するアポトーシスの関与する疾患の処置のための医薬、特に予防及び／又は治療のための医薬、すなわち予防・治療剤を提供する。ここで、対象となる疾患には、(1) 心疾患、好ましくは虚血性心疾患、特に心筋梗塞、心不全又は心虚血再灌流障害、
- 15 (2) 腎疾患、好ましくは腎不全、腎虚血、虚血性再灌流障害、または急性腎不全、(3) GVHD、(4) 虚血もしくは虚血再灌流障害又はそれに基づく疾患、特に、心臓、腎臓又は肝臓における虚血再灌流障害に基づく疾患、また、外科手術または移植に伴う虚血再灌流障害、あるいは血栓溶解療法もしくは血管再建術後の虚血再灌流障害またはそれらに基づく疾患(5) 細菌内毒素(エンド
- 20 トキシン) による臓器の障害、エンドトキシン血症、敗血症、またはそれらに伴う臓器もしくは組織、特に肝臓の障害又は肝不全、等が含まれる。

本発明の別の態様は、F a s アンタゴニストを有効成分として含有することを

特徴とする臓器保存剤である。また、本発明はF a s アンタゴニストを有効成分とするアポトーシス抑制剤を提供する。ここで該F a s アンタゴニストは、抗F a s リガンド抗体、抗F a s 抗体又はF a s 誘導体の少なくともいずれか一つであることが好ましく、特に該抗F a s リガンド抗体がヒト化抗F a s リガンド抗体であることが好ましい。

すなわち、本発明は、F a s アンタゴニストの新規な用途を提供する。

なお、本発明においてF a s アンタゴニストとは、抑制または阻害作用を有する物質であり、詳しくは、F a s /F a s リガンド系の生物作用、特に、F a s を介する細胞のアポトーシスを抑制または阻害する物質である。

10

図面の簡単な説明

第1図は、マウスF 9 1 9 - 9 - 1 8 抗体の軽鎖可変領域のc D N A 配列及び翻訳アミノ酸配列を示す図である。C D R に下線を引き、成熟鎖の1番目のアミノ酸には二重下線を引いた。

15 第2図は、マウスF 9 1 9 - 9 - 1 8 抗体の重鎖可変領域のc D N A 配列及び翻訳アミノ酸配列を示す図である。C D R に下線を引き、成熟鎖の1番目のアミノ酸には二重下線を引いた。

第3図は、ヒト化F 9 1 9 抗体の軽鎖可変領域のc D N A 配列及び翻訳アミノ酸配列を示す図である。C D R に下線を引き、成熟鎖の1番目のアミノ酸には二重下線を引いた。

20

第4図は、ヒト化F 9 1 9 抗体の重鎖可変領域のc D N A 配列及び翻訳アミノ酸配列を示す図である。C D R に下線を引き、成熟鎖の1番目のアミノ酸には二

重下線を引いた。

第5図は、F a s 誘導体の一つである s h F a s (n d 2 9) - F c をコードする c D N A の塩基配列を含むベクター (p M 1 3 0 4) 中の部分塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す図である (6 4 番のアミノ酸 (2 7 5 5 番の D N A) まで) 。

第6図は、F a s 誘導体の一つである s h F a s (n d 2 9) - F c をコードする c D N A の塩基配列を含むベクター (p M 1 3 0 4) 中の部分塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す図である (6 5 ~ 1 4 4 番のアミノ酸 (2 7 6 ~ 5 1 5 番の D N A)) 。 * 印は可能な N - グリコシレーションサイトを 10 示す。

第7図は、F a s 誘導体の一つである s h F a s (n d 2 9) - F c をコードする c D N A の塩基配列を含むベクター (p M 1 3 0 4) 中の部分塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す図である (1 4 5 ~ 2 2 4 番のアミノ酸 (5 1 6 ~ 7 5 5 番の D N A)) 。 * 印は可能な N - グリコシレーションサイトを 15 トを示す。

第8図は、F a s 誘導体の一つである s h F a s (n d 2 9) - F c をコードする c D N A の塩基配列を含むベクター (p M 1 3 0 4) 中の部分塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す図である (2 2 5 ~ 3 0 4 番のアミノ酸 (7 5 6 ~ 9 9 5 番の D N A)) 。

20 第9図は、F a s 誘導体の一つである s h F a s (n d 2 9) - F c をコードする c D N A の塩基配列を含むベクター (p M 1 3 0 4) 中の部分塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す図である (3 0 5 番のアミノ酸 (9 9

6 番のDNA) 以降)。

第10図は、Fas誘導体の一つであるshFas (nd29) - hinge をコードするcDNAの塩基配列を含むベクター (pM1317) 中の部分塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す図である (64番のアミノ酸 (275番のDNA) まで)。

第11図は、Fas誘導体の一つであるshFas (nd29) - hinge をコードするcDNAの塩基配列を含むベクター (pM1317) 中の部分塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す図である (65番のアミノ酸以降 (276～515番のDNA))。*印は可能なN-グリコシレーションサイトを示す。

第12図は、Fas誘導体の一つであるshFas (nd29) - hinge をコードするcDNAの塩基配列を含むベクター (pM1317) 中の部分塩基配列およびそれから推定されるアミノ酸配列を示す図である (516番のDNA以降)。

15 第13図は、Fas誘導体 (hFas-Fc) の実験的ラット心虚血再灌流障害モデルにおける心筋梗塞巣抑制効果を示す図である。

第14図は、Fas誘導体 (hFas-Fc) の実験的ラット心虚血再灌流障害モデルにおける再灌流3時間後の血漿中CPK値上昇抑制効果を示す図である。

20 第15図は、マウスGVHDモデルにおけるヒトFas-Fcの生存日数延長効果を示す図である。白四角 (□) はhFas-Fc 10mg/kg投与群、黒四角 (■) はコントロール群の生存率をそれぞれ示す。

第16図は、マウス肝障害モデルにおける抗ヒトFasリガンド抗体の致死抑制効果を示す図である。白四角(□)はF919-9-18 0.4mg/kg投与群、白三角(△)はF919-9-18 1.2mg/kg投与群、黒四角(■)はコントロール群の生存率をそれぞれ示す。

- 5 第17図は、抗マウスFasリガンド抗体(#58-11)の実験的ラット心虚血再灌流障害モデルにおける心筋梗塞巣抑制効果を示す図である。

第18図は、抗マウスFasリガンド抗体(#58-11)の実験的ラット心虚血再灌流障害モデルにおける再灌流3時間後の血漿中CPK値上昇抑制効果を示す図である。

- 10 第19図は、マウスGVHDモデルにおける抗マウスFasリガンド抗体(#58-11)の生存率改善効果を示す図である。白丸(○)はGVHD陰性群、黒丸(●)は#58-11 10mg/kg投与群、黒四角(■)はコントロール抗体10mg/kg投与群の生存率をそれぞれ示す。

- 第20図は、抗マウスFasリガンド抗体(#58-11)のマウス腎虚血灌流モデルにおける血漿中尿素窒素上昇抑制効果を示す図である。
- 15

第21図は、抗マウスFasリガンド抗体(#58-11)のマウス腎虚血灌流モデルにおける血漿中クレアチニン上昇抑制効果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- 20 以下にさらに詳細に本発明を説明する。

本発明の予防・治療剤の対象となる疾患には、種々の疾患が含まれる。これらの疾患は、Fas/Fasリガンド系の生物作用、特に、Fasを介するア

ポトースが関与するものである。詳しくは、それらの疾患において、F a s / F a s リガンド系の生物作用、特に、F a s を介するアポトースが、該疾患又は付随する症状もしくは病態の発症、維持又は増悪に関与又は寄与している。

具体的には、心疾患、腎疾患、GVHD、虚血再灌流障害、エンドトキシンに

- 5 起因する疾患等が挙げられ、(1) 心疾患としては、好ましくは虚血性心疾患、特に心筋梗塞、種々の原因による心筋炎、心筋症、特に拡張型心筋症、心不全、並びに虚血再灌流障害及びそれに基づく心疾患等が含まれる。心筋梗塞には、急性及び陳旧性が含まれる。心不全には、特に虚血性心疾患における心不全が含まれ、それは、急性又は陳旧性の心筋梗塞の合併症として起こることが多い。
- 10 (2) GVHDとしては、不適合性骨髄移植や先天性免疫不全症への骨髄移植等の骨髄移植後に起るGVHD、臓器移植後に起るGVHD、免疫低下した宿主に対する大量輸血等の輸血後に起るGVHD等が含まれる。GVHDは、GVH反応に基づく臓器又は組織の障害を伴い、下痢、体重減少及び痩身等の消耗症、皮疹、肝機能障害を含み、組織学的には、骨髄やリンパ組織の崩壊及び腸絨毛の萎縮を含む症状を特徴とする。
- 15

- (3) 腎疾患には、腎虚血、腎虚血再灌流障害、それらに基づく疾患、腎不全及びその原因疾患が含まれ、好ましくは急性腎不全等が挙げられる。急性腎不全には腎前性急性腎不全、腎後性急性腎不全及び腎性急性腎不全が含まれる。腎性急性腎不全の原因疾患には腎循環障害若しくは腎虚血性の急性尿細管壊死、腎毒性
- 20 による急性尿細管壊死、急性糸球体腎炎、急性間質性腎炎、急性皮質壊死が含まれる。

- (4) 虚血又は虚血再灌流障害に基づく疾患には、特に、心臓、腎臓、肝

臓、脳、肺、脾臓又は膵臓、好ましくは心臓、腎臓又は肝臓における虚血再灌流障害に基づく疾患、また、外科手術または移植に伴う虚血再灌流障害、および血栓溶解療法または血管再建術後の虚血再灌流障害に基づく疾患が含まれる。

- 「虚血再灌流障害」の語は、梗塞や外科手術、移植、血栓溶解療法あるいは血管再建術など種々の原因により局所の血流が全くなかった（虚血）後に再び血流が戻った（再灌流）際に起きる組織損傷や臓器または組織の機能障害であり、

「虚血再灌流障害に基づく疾患」の語は、肝臓、心臓、腎臓、脳、肺、脾臓、膵臓などにおいて認められ、例えば、肝不全、再灌流不整脈、腎不全などを含み、これらの疾患に付随する症状及び病態も含んでいる。

- 10 （５）細菌内毒素（エンドトキシン）に起因する疾患としては、エンドトキシンによる臓器の障害、エンドトキシン血症もしくは敗血症又はそれらにおける臓器障害およびそれらに基づく疾患が挙げられ、例えば、肝障害、急性肝不全、腎障害および腎不全等が挙げられる。

- （６）さらに、その他、臓器障害に基づく疾患等が本発明の予防・治療剤の対象疾患として含まれる。本明細書において、「臓器障害に基づく疾患」の語は、例えば肝不全、腎不全などの各種臓器不全のみならず、これらの疾患に付随する黄疸、血中GPT・GOT・LDH等の上昇、疲労・倦怠感、食欲不振、意識障害、興奮、昏睡、腹水、糸球体濾過量の低下、浮腫、蛋白尿、乏尿、高カリウム血症、代謝性アシドーシス、血中クレアチニン・尿素窒素量等の上昇などの症状も含んでいる。また、SIRSに伴うMODSも含んでいる。

本発明の予防・治療剤のその他の可能な対象疾患としては、ウイルス性肝炎又はアルコール性もしくは薬剤性の非ウイルス性肝炎もその用途に含まれる。

これらの疾患においては、該F a s アンタゴニストが臓器又は組織の細胞、例えば心筋細胞のアポトーシスを抑制する。

本発明の別の態様は、F a s アンタゴニストを有効成分として含有することを特徴とする臓器、例えば、心臓、腎臓、肝臓等の臓器保存剤である。

5 なお、治療対象としては、ヒトが重要であるが、ヒト以外の動物も含みうる。

本発明で使用されるF a s アンタゴニストは、F a s / F a s リガンド系アンタゴニストと言うべきものであり、F a s によるシグナルの発生又は伝達をいずれかの段階で何らかの形で遮断し、F a s / F a s リガンド系の機能又は生物作用、特に、F a s を介するアポトーシス、特にF a s リガンドによるF a s を介するアポトーシスを抑制又は阻害するものであれば、特に限定されず、F a s リガンドもしくはF a s の作用もしくは機能を阻害するもの、F a s リガンド細胞外領域もしくはF a s 細胞外領域と相互作用するもの、F a s リガンドとF a s の相互作用を阻害するもの、F a s 細胞内領域とそれと相互作用する細胞内因子との間の相互作用に影響するもの、またはF a s を介するアポトーシスのシグナル伝達に関与する細胞質内因子（例えばI C E 様プロテアーゼ）の活性を抑制するもの等の様々な作用機序を有するものが含まれる。また、タンパク質性の高分子物質および低分子の化合物のいずれもが含まれる。具体的には、本発明で使

10 用されるF a s アンタゴニストとしては、F a s / F a s L 系の作用、特にF a s

15 を介するアポトーシスを抑制する活性を有する、F a s 誘導体、抗F a s リガンド抗体、抗F a s 抗体、F a s もしくはF a s リガンドの遺伝子もしくはmR N A に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド、F a s の細胞内領域と相互作用す

20

る物質、またはICE阻害剤等が挙げられる。ここで、本発明で用いるFasアンタゴニストとしては、Fasを介するアポトーシスを抑制する作用を有する、Fas誘導体、抗Fas抗体、又は抗Fasリガンド抗体が好ましい。さらに、Fas及びFasリガンドはヒト由来のものが好ましく、抗Fas抗体及び抗Fasリガンド抗体はそれぞれ抗ヒトFas抗体及び抗ヒトFasリガンド抗体が好ましく、抗Fasリガンド抗体は、ヒト化抗Fasリガンド抗体であるのが好ましい。ヒト化抗Fasリガンド抗体とは、定常領域と、フレームワーク領域がヒト由来で、相補性決定領域が非ヒト由来であるのが好ましい。また、本発明で用いるFasアンタゴニストは、国際特許出願公開番号WO 95/13293などに記載されている適当なアッセイ法においてFas発現細胞のアポトーシスを抑制するものが好ましい。

なお、本明細書において引用する文献はこれらをもって本明細書の一部と成す。

なお、本発明で用いられる抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよく、また、本発明に使用される抗体の分子種は特に限定されない。通常の状態の抗体分子であってもよいし、さらには抗原に結合し、Fas抗原を介するアポトーシスを阻害するかぎり抗体の断片、たとえば、Fab、F(ab')₂、Fv、又はH鎖とL鎖のFvを一本鎖となるよう適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv)も使用することができ。また、いずれのクラス、サブクラス及びイソタイプに分類される免疫グロブリンであってもよい。これら抗体はFasリガンド又はFasと結合することにより、Fas/Fasリガンド系の生物作用、特に、Fasを介するアポトー

シスを阻害する機能を有するものであれば特に限定されない。

本発明で使用する抗F a s リガンド抗体又は抗F a s 抗体はその由来、種類
(モノクローナル、ポリクローナル) 及び製法を問わないが、哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。また、本発明に用いるモノクローナル抗体の産生
5 細胞の動物種は哺乳類が好ましく、ヒト由来またはヒト以外の哺乳動物由来
であってよい。ヒト以外の哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ウサギ
あるいはげっ歯類由来のモノクローナル抗体が好ましい。げっ歯類としては、特に制限されないが、マウス、ラット及びハムスターなどが好ましく例示される。
これらの動物を用いるとモノクローナル抗体作製が簡便だからである。また、該
10 モノクローナル抗体としては、放射免疫測定法 (R I A)、酵素免疫測定法
(E I A, E L I S A)、蛍光抗体法 (I m m u n o f l u o r e s c e n c e
A n a l y s i s) 等の通常の免疫学的手段により抗原を認識し、また、国際特
許出願公開番号WO 9 5 / 1 3 2 9 3 などに記載されている適当なアッセイ法に
よりF a s を発現する細胞のアポトーシスに対する抑制活性が測定されるものが
15 好ましい。

これらのうちでも特に、平成7年6月22日付で日本国茨城県つくば市東
一丁目一番三号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し (受託番号
P - 1 5 0 0 2)、さらに平成8年5月9日付で原寄託から国際寄託に移管した
(受託番号F E R M B P - 5 5 3 5) ハイブリドーマF 9 1 9 - 9 - 1 8 によ
20 り産生されるマウスF 9 1 9 - 9 - 1 8 抗体が好ましい例である。該抗体の可変
領域配列を図1 (配列番号1にc D N Aを記載) 及び図2 (配列番号2にc D N
Aを記載) に示した。

本発明で用いる抗F a s リガンド抗体及び抗F a s 抗体は、例えば、国際特許出願公開番号WO 9 5 / 1 3 2 9 3、国際特許出願番号P C T / J P 9 6 / 0 1 8 2 0、国際特許出願公開番号WO 9 5 / 1 0 5 4 0 などに記載されている方法を用いて作製することが出来る。

- 5 本発明においてモノクローナル抗体を用いる場合は、公知技術を使用して作製してもよく、例えば、F a s もしくはF a s リガンド又はそれらの部分ペプチド等を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすること
- 10 によって作製できる。

- より具体的には、感作抗原が、ヒトF a s リガンド又はその断片の場合、T a k a h a s h i T. 等、I n t e r n a t i o n a l I m m u n o l o g y、6 巻、1 5 6 7 - 1 5 7 4 頁、1 9 9 4 年に開示されたヒトF a s リガンドの遺伝子配列を用い、該遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な
- 15 宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または、培養上清中から目的のF a s リガンドタンパク質を精製し、この精製F a s リガンドタンパク質を感作抗原として用いるのが好ましい。

- 感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、マウス、
- 20 ラット、ハムスター、ウサギ等が使用できる。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法を用いることが出来る。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物か

ら免疫細胞が取り出され、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、特に限定されないが、哺乳動物、特にマウス等の公知の種々のミエローマ細胞株、例えば、P 3 - X 6 3 - 5 A g 8 - U 1 (P 3 - U 1) 等が好適に使用される。前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (M i l s t e i n ら、M e t h o d s E n z y m o l. 7 3 : 3 - 4 6, 1 9 8 1) 等に準じて行うことができる。

次いで、公知の方法により、目的とする本発明で用いる抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニング及び単一クローン化が行われる。

このようにして作製される、本発明で用いるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清から得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に移植して増殖させ、その腹水から得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

さらに、前記の方法により得られる本発明に用いるモノクローナル抗体は、塩析法、ゲル濾過法、アフィニティークロマトグラフィー法等の公知の精製手段を利用して高純度に精製してもよい。

20 本発明に使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマを用いる方法に限られず、E B V等によって不死化した抗体産生細胞を用いる方法、遺伝子工学的に作製する方法を用いて作製することもできる。

また、本発明で用いる抗F a s リガンド抗体及びF a s 抗体は、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変したキメラ抗体またはヒト化抗体がより好ましい。

これは、非ヒトモノクローナル抗体、例えばマウス抗体の使用は、ヒトの治療
5 において、繰り返しの治療療養法において欠点を有するからである。第一の欠点は、マウスモノクローナル抗体は、比較的短い循環半減期を有し、そして、ヒトに用いられた場合は、他の重要な免疫グロブリンの機能的特性を欠くことである。

第二の欠点は、非ヒトモノクローナル抗体は、ヒト患者中に注入されたときに
10 免疫原性となるアミノ酸の実質的長さを含むことである。すなわち、多くの研究により、外来の抗体の注入後、患者によって引き起こされた抗体に対する免疫応答が、非常に強くなり得て、最初の処置後の抗体の治療的有用性を本質的に排除してしまうことが示されている。さらに今後種々のマウス若しくは他のヒトに対する抗原性を有するモノクローナル抗体が開発されたときには、いずれかの
15 異なった非ヒト抗体を用いた最初若しくは初期数回の処置の後、それに続く関連のない療法のための処置でさえ、交叉反応性のために効果がなかったり、若しくはそれ自身が危険な物質となることがあり得る。

本発明で用いる事ができるキメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物、例えば、マウスのモノクローナル抗体の可変領域とヒト抗体の定常領域とからなる。このよう
20 なキメラ抗体は、既知のキメラ抗体の製造方法、特に遺伝子組換え技法を用いて製造することができる。

さらに好ましくは、再構成 (r e s h a p e d) したヒト型抗体を本発明に用

いることができる。これはヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域（CDR）をヒト抗体の相補性決定領域へ置換したものである。すなわち、定常領域と、フレームワーク領域がヒト由来で、相補性決定領域が非ヒト由来であるのが好ましい。本発明に有用な再構成ヒト型抗体（ヒト化抗体）の好

5 適な例としては、国際特許出願公開番号WO 97/02290（出願番号PCT/JP 96/01820）に開示されているマウス抗体F 9 1 9 - 9 - 1 8 抗体のCDRを有するものが挙げられる。その可変領域の1例を図3（配列番号3にcDNAを記載）及び図4（配列番号4にcDNAを記載）に示した。

なお、必要に応じ、ヒト化抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成

10 するように抗体の可変領域のフレームワーク（FR）領域の1以上のアミノ酸を置換してもよい。

本発明に用いるヒト化抗体を製造するには、リーチマンら、ネーチャー、332:323（1988）及びヨーロッパ特許公開第0239400号公報、クイーンら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:

15 10029（1989）、国際特許出願公開公報WO 90/07861及びWO 92/11018、Co等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2869（1991）、Co及びQueen、Nature、351巻、501頁、1991年、ならびに、コーら、J. Immunol. 148: 1149（1992）等

20 本発明で使用されるFas誘導体は、少なくともFasリガンドとの結合能を有するか、もしくはFasリガンドによるアポトーシスを抑制するものであれば、特に限定されない。公知のFasのアミノ酸配列中に置換、欠失、付加ま

たは／および挿入といった任意の変異を有し、F a s リガンドとの結合活性を維持したまま、F a s / F a s リガンド系の生物作用、特に、F a s を介するアポトーシスを阻害するものが含まれる。さらに該F a s 誘導体には、F a s 変異体、切断型 (t r u n c a t e d f o r m) F a s 、キメラタンパク質、融合タンパク質および化学的に修飾されたものも含まれる。なお、その由来となるF a s は上記の性質を有する限り、その動物種を問わないが、抗原性を考慮すればヒト由来のものを使用するのが好ましい。

具体的には、公知のF a s の細胞外領域、膜貫通領域を欠失したF a s 抗原、及びF a s 細胞外領域と他の蛋白質とのキメラ蛋白質、例えばヒトF a s 細胞外領域とヒト免疫グロブリンのF c 断片のキメラ蛋白質であるh F a s - F c 等が挙げられる。F a s 誘導体は、何れの製法のものでも良く、公知のF a s の配列及び公知の遺伝子組み換え技術等により、製造することができる。例えば、ヒトF a s - F c の製法は、国際特許出願公開番号WO 9 5 / 1 3 2 9 3 の実施例中などに記載されている。また、F a s のN末端に欠失を有するF a s 誘導体も好ましく、平成8年3月14日付で日本国茨城県つくば市東一丁目一番三号の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託し（受託番号P - 1 5 5 1 4 及びP - 1 5 5 1 5）、さらに平成9年3月6日付で原寄託から国際寄託に移管（受託番号F E R M B P - 5 8 5 4 及び受託番号F E R M B P - 5 8 5 5）されている大腸菌が含むプラスミド（p M 1 3 0 4 及びp M 1 3 1 7）（台湾寄託番号はそれぞれC C R C 9 4 0 1 7 1 およびC C R C 9 4 0 1 7 0）にコードされているF a s 誘導体は、公知のヒトF a s のN末端の1番目から29番目までのアミノ酸配列を欠失したF a s 細胞外領域を含有する誘導体（図5～9 および配列番

号5にshFas(nd29)-FcをコードするcDNAの塩基配列を含むベクター(pM1304)中の部分塩基配列を記載し、図10～12および配列番号6にFas誘導体の一つであるshFas(nd29)-hingeをコードするcDNAの塩基配列を含むベクター(pM1317)中の部分塩基配列を記載)であるが、その活性が高く、本発明の予防・治療剤の有効成分として好適な例である。これらの本発明に用いるFas誘導体は、適当なアッセイ法によりFasリガンドに対する結合活性又はFasを介するアポトーシスの抑制活性を有することがわかる。

本発明で使用されるFas又はFasリガンドの遺伝子またはmRNAに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドは、Fas又はFasリガンドの発現を抑制するものであれば、その配列は限定されず、例えば国際特許出願公開番号WO95/13293に開示されているFasリガンドのアンチセンスオリゴヌクレオチド等が挙げられる(本明細書はこの文献を引用して明細書の内容とする)。

15 本発明の予防・治療剤は、上述のFasアンタゴニストを含有することを特徴とし、少なくとも一種の医薬用担体、または媒体、例えば、滅菌水や生理食塩水、植物油、鉱油、高級アルコール、高級脂肪酸、無害性有機溶媒等、さらには必要に応じて賦形剤、着色剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、溶解補助剤、吸着防止剤、安定化剤、保存剤、保湿剤、酸化防止剤、緩衝剤、等張化剤、無痛化
20 剤等と適宜組み合わせて注射剤や経口剤などの医薬組成物やキットの形態をとることができる。本発明の予防・治療剤は、好ましくは非経口的に、たとえば、静脈内注射、冠動脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身ある

いは局部的に、ならびに急速もしくは持続的に投与することができる。本発明の
予防・治療剤のヒトに対する投与量は患者の病態、年齢あるいは投与方法により
異なるが、適宜適当な量を選択することが可能である。例えば、全身投与の
場合、約 0.1 - 100 mg/kg の範囲で適当な分割容量を選択することがで
5 きる。しかしながら、本発明の予防・治療剤の使用はこれらの投与方法および投
与量に制限されるものではない。さらに、複数の Fas アンタゴニストを組み合
わせて使用したり、他の薬剤と併用してもよい。

本発明の心疾患予防・治療剤は常法にしたがって製剤化することができる。た
とえば、注射用製剤は、精製された Fas アンタゴニストを溶剤、たとえば、生
10 理食塩水、緩衝液などに溶解し、それに、必要に応じて吸着防止剤などを加えた
ものであり、または、使用前に溶解再構成するために凍結乾燥したものであって
もよく、凍結乾燥のための一般的な賦形剤を使用することができる。

本発明の疾患の予防・治療剤に用いる Fas アンタゴニストは、心疾患
モデル、特に実施例のような心虚血再灌流モデルにおいて、または GVHD モデ
15 ル、特に実施例に記載するような GVHD モデルにおいて、宿主の臓器及び組織
の障害を抑制し、生存日数延長及び生存率上昇効果を示す。また、腎疾患モデル
において、血清クレアチニンの上昇抑制作用を示し、さらに、エンドトキシン誘
発肝障害モデルにおいて、肝障害の指標である GOT、GPT 等の上昇抑制作用
及び生存率上昇効果を示す。よって、本発明の疾患の予防・治療剤は、前述した
20 ような疾患の患者等に投与することにより、各種臓器又は組織の細胞の障害及び
細胞死、特にアポトーシスを抑制し、該疾患の予防又は治療効果、およびそれに
付随する症状の緩和及び病態の改善効果、ならびに症状の進行や悪化を抑制する

効果を有する。

また、インビトロでの細胞障害抑制活性、心臓および腎臓の虚血再灌流モデルにおける組織障害を抑制したことから、各種臓器の保存効果を有する。

また、抗Fasリガンド抗体を用いた実施例ではげっ歯類（マウスおよびラット）で実験を行っているため、主に抗マウスFasリガンド抗体を使用し予防・治療剤の効果を示しているが、ヒトに用いる場合は抗ヒトFasリガンド抗体およびヒト化抗Fasリガンド抗体により実施例と同様の効果が期待できる。

本発明に用いるFasアンタゴニストは、心疾患、GVHD、腎疾患、虚血再灌流障害に基づく疾患及び臓器障害に基づく疾患に対する予防・治療作用、並びに臓器保存剤としての作用及び細胞アポトーシス抑制作用を有する。従って、本発明に用いるFasアンタゴニスト及びそれを含有する薬剤は、Fasの関与する疾患、特にFasを介するアポトーシスの関与する疾患の予防治療剤として有用である。例えば、心疾患、特に心筋梗塞等の虚血性心疾患、種々の原因による心筋炎、心筋症、特に拡張型心筋症、心不全、並びに虚血再灌流障害及びそれに基づく心疾患等を予防・治療することができる。

また、前記した種々のGVHD、およびGVHDに伴う症状又は病態の予防又は治療のために使用できる。GVHDには、不適合性骨髄移植や先天性免疫不全症への骨髄移植等の骨髄移植後に起るGVHD、臓器移植後に起るGVHD、免疫低下した宿主に対する大量輸血等の輸血後に起るGVHD等が含まれる。GVHDは、GVH反応に基づく臓器又は組織の障害を伴い、下痢、体重減少及び痩身等の消耗症、皮疹、肝機能障害を含み、組織学的には、骨髄やリンパ組織の崩壊及び腸絨毛の萎縮を含む症状を特徴とし、これらのGVHDに伴う症状又は病

態の予防又は治療のためにも使用できる。

肝臓、心臓、腎臓、肺、脾臓、小腸、大腸、胃、膵臓、脳、筋肉、皮膚などにおいて認められる虚血再灌流障害及びそれに基づく疾患、例えば、肝不全、再灌流不整脈、腎不全、壊死性腸炎などで各臓器の損傷や機能障害を直接予防・治療

5 する目的で用いることができる。また、外科手術や移植に伴う虚血再灌流の際に、術前・術後に投与することにより、上記の臓器または組織の障害を予防または治療し、移植後の上記の臓器または組織の生着率を改善する効果および機能を維持する効果が期待される。さらに組織損傷または壊死性梗塞巣の形成・拡大

10 れる。また、血栓溶解療法あるいは血管再建術後の虚血再灌流障害に基づく疾患の予防・治療剤として用いることができる。また、種々の臓器障害に基づく疾患、例えば、肝不全、腎不全など、肝臓、腎臓などの損傷や機能障害を直接予防・治療する目的で使用することができ、また、これらの疾患に付随する黄疸、

15 血中GPT・GOT・LDH等の上昇、疲労・倦怠感、食欲不振、意識障害、興奮、昏睡、腹水、糸球体濾過量の低下、浮腫、蛋白尿、乏尿、高カリウム血症、代謝性アシドーシス、血中クレアチニン・尿素窒素量等の上昇などを予防、治療または改善する目的で使用することができる。また、上記の組織または臓器を移植する際の保存液中に添加する、臓器の灌流液中に添加する等の方法により、移植時における臓器保存剤として用いることができる。さらに、Fasの関与する

20 種々の疾患、例えば、上述した虚血再灌流障害に基づく疾患の予防・治療剤として用いることができる。さらには、SIRSに伴うMODSの予防・治療剤としても用いることができる。

本発明に用いる Fas アンタゴニストは、エンドトキシンによる臓器障害、特に肝臓障害又はエンドトキシン血症もしくは敗血症において、急性期のみならず、慢性的な障害をも抑制する。従って、本発明に用いる Fas アンタゴニストは、これらに基づく疾患および付随する病態について予防、治療または改善することが期待され、医薬品としては非常に好ましい特性を有すると考えられる。

本発明に用いる Fas アンタゴニストは、肝臓においては、移植などの外科的手術時、あるいはショックおよび循環不全などによる肝血流量（血液供給）の減少あるいは遮断の際の虚血再灌流障害において、肝不全や組織障害ならびに肝機能低下に対する予防、治療または改善作用が期待される。また、心臓においては、心筋梗塞に対する血栓溶解療法、経皮的冠動脈内血栓溶解療法（PTCR）や経皮的冠動脈内腔拡張術（PTCA）後の再灌流の結果、細胞内カルシウムイオンの過負荷等に起因する不可逆的な細胞死や致死的な不整脈に対する予防、治療または改善作用が期待される。また、腎臓においては、術後または腎移植等に起因する腎虚血、腎虚血再灌流障害、それらに基づく疾患、腎不全、その原因疾患及び糸球体固有細胞（内皮細胞、上皮細胞、メサンギウム細胞）、メサンギウム基質、基底膜の細胞外基質または尿細管上皮細胞などの障害に対する予防、治療または改善作用が期待される。

実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1. s h F a s (n d 2 9) - F c 及び s h F a s (n d 2 9) -
5 h i n g e の調製

(1) 形質転換体の作製および培養

p M 1 3 0 4、p M 1 3 1 7、および国際特許出願公開 W O 9 5 / 1 3 2 9 3 の
実施例 1 に記載の p B F - F c 1 (ヒ ト F a s 抗原の細胞外領域とヒト I g G 1
の F c 領域とのキメラ蛋白質 (h F a s - F c と表記することがある) の発現プ
10 ラスミド) を使用して、以下の方法で形質転換体 C O S - 1 / p M 1 3 0 4、C
O S - 1 / p M 1 3 1 7、C O S - 1 / p B F - F c 1 を作製した。すなわち、
それぞれのプラスミド DNA 1 0 0 μ g を 5 0 0 μ l の 1 0 m M T r i s -
H C l (p H 7 . 4) / 1 m M エチレンジアミン四酢酸 (以下、T E バッファー
と略す) 溶液に溶解した。これらに、それぞれ 0 . 2 m g / m l D E A E - デキ
15 ストランおよび 5 0 m M T r i s - H C l (p H 7 . 4) を含有する D -
M E M (日水製薬) 1 2 5 m l を添加し、DNA - D E A E デキストラン混合液
を作製した。1 7 0 0 c m² ローラーボトル (コーニング社製) でセミコンフル
エントまで単層培養した C O S - 1 細胞に DNA - D E A E デキストラン混合液
を添加し、3 7 ° C にて培養し、形質転換体 C O S - 1 / p M 1 3 0 4、C O S -
20 1 / p M 1 3 1 7、C O S - 1 / p B F - F c 1 を得た。4 時間後、DNA
- D E A E デキストラン混合液を除去し、1 0 % ウシ胎児血清 (ライフテッ
クオリエンタル社製) を含有する D - M E M 培地に交換し、さらに 2 4 時間培養

した。その後、培地をphenol red free D-MEM (FBS, BSA無添加) に交換し、さらに72時間培養した後、培養上清を回収した。

(2) shFas (nd29) -Fcの精製

①アフィニティークロマトグラフィー

- 5 COS-1/pM1304培養上清1lを、硫酸沈殿(70%飽和)した後、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)に懸濁し、PBSに対して透析した。得られた懸濁液57mlを、使用説明書に従い、アフィプレッププロテインAプレパラティヴカートリッジ(バイオラッド社製; 7.3ml)カラムにアプライし、溶出しshFas (nd29) -Fcを回収した。フィルترونオメガセル(フ
- 10 ジフィルター社製; 分画分子量30kD)を用いて限外濾過を行い、濃縮した。この濃縮液を0.9%NaClに対して透析し、精製shFas (nd29) -Fcを得た。また、同様にして、hFas -Fcを精製した。各標品のタンパク質量はウシ血清アルブミンを標準物質としてLowry法で測定した。

- 得られた精製shFas (nd29) -Fcを、0.1%SDSを含む
- 15 5-20%グラジエントゲルを用いたポリアクリルアミドゲル上で電気泳動を行い、2D-銀染色試薬・II「第一」(第一化学薬品社製)で染色し、バンドを検出した。精製されたshFas (nd29) -Fcは非還元下で2量体に相当する分子量約85kD、還元下で単量体に相当する約43kDのほぼ1本のバンドとして検出された。

- 20 得られた精製shFas (nd29) -Fcを、予め0.05%トリフルオロ酢酸にて平衡化したVYDAC C4カラム(4.6mmφ×25cm、サイプレス社製)に供し、次いでカラムを0.05%トリフルオロ酢酸で洗浄した。洗

浄後、0.05%トリフルオロ酢酸/0~100%アセトニトリルを使用し、直線濃度勾配法により流速1ml/分にて溶出を行った。

溶出されたメインピークの画分を凍結乾燥し、70%蟻酸に溶解してサンプルとし、モデル477Aプロテインシーケンシングシステム-120APTHアナライザー（パーキンエルマー社製）を使用し、そのN末端アミノ酸配列を決定した。即ち、PTHアミノ酸の検出を270nmの紫外部吸収にて行い、予め同一の方法で分離した標準PTHアミノ酸（パーキンエルマー社製）の保持時間を基準にしてアミノ酸を同定した。この結果、ヒトFas抗原のN末端アミノ酸29残基を欠失したN末端アミノ酸配列（ThrGlnAsnLeuGluGlyLeuHisHisAsp）を有していることが確認された。

(3) shFas(nd29)-hingeの精製

ヒトFas抗原で免疫したマウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞を用いて公知の方法（KohlerとMilstein, Nature, 256巻、495頁、1975年）で作製した、抗Fasモノクローナル抗体（4B4-B3）を、ホルミルセルロファイン（生化学工業社製）と混合し、常法に従い、抗体アフィニティーカラムを作製した。

COS-1/pM1317培養上清10lを、フィルترونミニセット（分画分子量10kD；フジフィルター社製）で限外濾過濃縮し、1.5lとした。その後、濃縮液に1M Tris-HCl（pH9.0）を添加してpH8.0に調製し、1M NaClを含む50mM Tris-HCl（pH8.0）にて予め平衡化した抗Fas抗原モノクローナル抗体固定化アフィニティーカラムにアプライした。カラムを1M NaClを含む50mM Tris-

HCl (pH 8.0) 320 ml で洗浄後、1 M NaCl を含む 0.1 M glycine-HCl (pH 2.5) で shFas (nd29)-hinge を溶出した。shFas (nd29)-hinge を含む画分をプールし、フィルトロンオメガセル (分画分子量 10 kD ; フジフィルター社製) を用いて限外
5 濾過を行い、濃縮した。この濃縮液を 0.9 % NaCl に対して透析し、精製 shFas (nd29)-hinge を得た。

得られた精製 shFas (nd29)-hinge を、0.1 % SDS を含む 5-20 % グラジエントゲルを用いたポリアクリルアミドゲル上で電気泳動を行い、2D-銀染色試薬・II「第一」 (第一化学薬品社製) で染色し、バンドを検
10 出した。精製された shFas (nd29)-hinge は非還元下で分子量約 43 kD 及び約 27 kD の 2 本のバンドとして、還元下で約 23 kD 及び 27 kD の 2 本のバンドとして検出された。

上記で得た精製 shFas (nd29)-hinge を用い、前記と同様に、その N 末端アミノ酸配列を決定した。その結果、ヒト Fas 抗原の N 末端アミノ
15 酸 29 残基を欠失した N 末端アミノ酸配列を有していることが確認された。

(4) shFas (nd29)-Fc、shFas (nd29)-hinge 及び hFas-Fc のアポトーシス抑制活性の比較

shFas (nd29)-Fc 及び hFas-Fc が 1A12 細胞及び FLm14 細胞の WC8 細胞及び W4 細胞に対する細胞障害活性を抑制する活性を指標
20 として測定した。1A12 細胞はヒト Fas リガンドを発現するようにマウス WR19L 細胞を形質転換させた細胞であり、また、FLm14 細胞はマウス Fas リガンドを発現するようにマウス FDC-P1 細胞を形質転換させた細胞

である。WC 8細胞はヒトF a s抗原を、W 4細胞はマウスF a s抗原を発現させるようにマウスWR 1 9 L細胞を形質転換させた細胞である。このWR 1 9 L細胞は、マウスF a s抗原を殆ど発現せず、TNFの細胞障害作用に感受性の細胞である。細胞障害活性の測定は、ルービエ E. (R o u v i e r E.) 等の方法に準じて行った (J. E x p. M e d., 1 7 7 巻、1 9 5 - 2 0 0 頁、1 9 9 3 年)。先ず、1 A 1 2 細胞或はF L m 1 4 細胞を1 0 %非働化F B S 含有R P M I 1 6 4 0 で洗浄し、エフェクター細胞とした。一方、1 0 0 μ l の1 0 %非働化F B S 含有R P M I 1 6 4 0 中で、2 0 μ C i の [5 1 C r] クロム酸ナトリウム (N E N 社製) と共に $1 \times 1 0^6$ 個のWC 8細胞または W 4 細胞を3 7 $^{\circ}$ C で2 時間インキュベートした。1 0 %非働化F B S 含有R P M I 1 6 4 0 で洗浄した後、これらの細胞をターゲット細胞として使用した。 $1 \times 1 0^4$ 個の1 A 1 2 細胞或は $1 \times 1 0^5$ 個のF L m 1 4 細胞とターゲット細胞 $1 \times 1 0^4$ 個とを、様々な濃度のs h F a s (n d 2 9) - F c 及びh F a s - F c と丸底のマイクロタイタープレートの各ウェル中で混合した。このとき全液量が計1 0 0 μ l になるようにした。8 0 0 r p m で2 分間、プレートの遠心操作を行った後、3 7 $^{\circ}$ C で4 時間インキュベートした。更に、1, 2 0 0 r p m で5 分間プレートの遠心操作を行い、各ウェルより上清5 0 μ l を分取して γ カウンターを用いて放射活性を測定し、特異的細胞溶解率を算出した。51 C r の自然放出は、培地のみでターゲット細胞をインキュベートすることにより決定し、一方、最大放出量は、ターゲット細胞に0. 1 %となるようにT r i t o n X - 1 0 0 を加えることにより決定した。

1 A 1 2 細胞をエフェクター細胞とし、WC 8 細胞をターゲット細胞としたと

き、および、FLm14細胞をエフェクター細胞とし、W4細胞をターゲット細胞としたときのshFas(nd29)-Fc及びhFas-Fcの特異的細胞障害抑制活性を比較したところ、shFas(nd29)-Fcは、hFas-Fcと比較して3~10倍高い細胞障害抑制活性を有していた。

- 5 同様に、shFas(nd29)-hingeはhFas-Fcと比較して3~10倍高い細胞障害抑制活性を有していた。

実施例2. Fasアンタゴニストの心疾患モデルにおける効果

(1) 心虚血再灌流モデルの作製

- 320~450gの雄性Wistarラット（日本チャールスリバー（株）製）にネ
10 ンブタール（大日本製薬（株）製）60mg/kgを腹腔内投与し、麻酔した。35℃に保温した保温台（IKEDA SCIENTIFIC CO. LTD製）上に仰臥位にラットを固定後、気管を切開し人工呼吸器（シナノ製作所製 SN-480-7）を接続した。次に左側胸部第4肋間で開胸し心臓を露出し、左冠状動脈の起支部より2~3mm上流を糸付き縫合針（眼科用弱湾針、
15 （株）夏目製作所製）を用いて片蝶結びにて結紮した。20分後に片蝶結びを解くことで結紮を解除し、再灌流を3時間行った。次に虚血領域を決定するために、再び結紮を行い、左大腿静脈から1%エバンスブルー含有生理食塩水を投与した。その後、心臓を摘出し、液体窒素で凍結後、剃刀刃（フェザー安全剃刀（株）製）を用いて5つの切片に分け、1% TTC（塩化2、3、5、トリフェ
20 ニルテトラゾリウム、和光純薬工業（株）製）含有生理食塩水中で37℃、20分染色した。各切片は以後の解析まで、10%中性緩衝ホルマリン液中に保存した。また、血漿中クレアチンキナーゼ（CPK）測定用に、再灌流1時間後およ

び3時間後に頸静脈から採血を行った。

(2) ヒトF a s - F c の投与

ヒトF a s - F c (h F a s - F c) は、国際特許出願公開番号WO 9 5 / 1 3 2 9 3 の実施例1に記載の方法に従って調製したものを使用した。0. 1 %ヒト血清アルブミン((財)化学及血清療法研究所製)含有生理食塩水にて希釈し、1mg / 10ml / kgの用量で、再灌流開始直後に右大腿静脈から投与した。なお、コントロール群には0. 1 %ヒト血清アルブミン含有生理食塩水を投与した。h F a s - F c 1mg / kg投与群を5例、コントロール群を8例とした。

10 (3) 各切片中の非虚血領域、虚血領域、壊死領域の測定

各切片の非虚血領域(エバンスブルー陽性、TTC陽性領域)、虚血領域(エバンスブルー陰性、TTC陽性領域)、壊死領域(エバンスブルー陰性、TTC陰性領域)の割合は以下の方法で算出した。心切片の両面(上面、下面)について、実体顕微鏡(SHZ10、オリンパス光学工業(株)製)からの画像を
15 画像解析ソフト(Image Command 5.098、オリンパス光学工業(株)製)に入力し、モニター上で非虚血領域、虚血領域、壊死領域を分画し、分画した画面をプリンターに打ち出した。打ち出した画像中の各領域の面積をデジタルプランイメーター((株)内田洋行製)を用いて測定した。次に以下の式により、各領域の湿重量を計算した。切片の上面、下面の各領域の面積比を
20 各々A、Bとすると各領域の湿重量 = $0.5 \times (A + B) \times \text{切片湿重量}$ である。

(4) 心標本に占める非虚血領域、虚血領域、壊死領域の比率(%)の算出

各切片における非虚血領域の湿重量の和を全非虚血領域の湿重量とした。

また、全非虚血領域の湿重量と各切片の湿重量の和（心標本全湿重量）の比率（％）を心標本に占める非虚血領域の比率（％）とした。同様に、虚血領域、壊死領域について全湿重量および、心標本に占める比率（％）を算出した。

5 （５）血漿中クレアチンキナーゼ（ＣＰＫ）測定

血漿中ＣＰＫ値は、ＣＰＫテストワコーおよび、オートアナライザー（ＣＯＢＡＳＦＡＲＡ、ロッシュ社製）を用いて測定した。

（６）結果

h F a s - F c 投与群の虚血領域に対する壊死領域の比率（％）はコントロール群よりも低かった（図 1 3）。また、h F a s - F c 投与群の血漿中クレアチンキナーゼ（ＣＰＫ）活性値はコントロール群よりも低かった（図 1 4）。

実施例 3. h F a s - F c の毒性試験

（１）方法

7 週齢の雌性 I C R マウス（日本エスエルシー（株）製）に h F a s - F c 2. 5 m g / k g を連日 3 日間腹腔内に投与した。対照群には生理食塩水を投与した。投与開始前日から、投与終了の翌日まで、連日体重を測定し、h F a s - F c 投与の体重に及ぼす影響を調べた。また、投与終了の翌日に剖検を実施し、主要臓器の肉眼的観察及び脾細胞数の測定を行い、h F a s - F c 投与の影響を調べた。

20 （２）結果

連日 3 日間の h F a s - F c 2. 5 m g / k g の腹腔内投与は、体重および脾細胞数に影響を及ぼさなかった。また、剖検においても h F a s - F c 投与によ

る影響は観察されなかった。

実施例 4. Fas アンタゴニストのマウスGVHDモデルにおける効果

(1) 宿主マウスの骨髄抑制

宿主マウスとして、雄性、6週齢、BDF1マウス（日本チャールスリバー（株）製）を用いた。宿主マウスの腹腔内にシクロホスファミド（塩野義製薬（株）、エンドキサン）を450mg/kgを投与し骨髄抑制を誘導した。

(2) 供与マウス由来脾臓リンパ球の調製および宿主マウスへの移植

供与マウスとして雄性、7週齢、C57BL/6マウス（日本チャールスリバー（株）製）を用いた。供与マウスの脾臓をハンス液（日水製薬（株）製）中でピンセットを用いてほぐした後、遠心し、得られた細胞を0.017M トリス-0.747%塩化アンモニウム溶液中に懸濁し赤血球のみを溶血させた。残った細胞をハンス液で洗浄したものを供与マウス由来脾臓リンパ球とし、前述のシクロホスファミド投与1日後の宿主マウスに 3×10^7 個/マウス尾静脈から移植した。

15 (3) hFas-Fcの効果検討

供与マウス由来脾臓リンパ球移植の翌日から、hFas-Fc1、3、10mg/kgを2日に1回、尾静脈から投与し、生存日数に対する効果を調べた。なお、コントロール群にはhFas-Fcの希釈液である0.1%ヒト血清アルブミン（（財）化学及血清療法研究所製）含有生理食塩水を投与し、各群n=5とした。その結果、コントロール群に比較して、hFas-Fc10mg/kg投与群に生存日数延長効果が認められた（図15）。また、体重減少も軽度であった。

実施例 5. shFas (nd 29) -Fc 生産 CHO 細胞 (CHO (pM 1304) 72-105-55) の作製

(1) shFas (nd 29) -Fc 形質転換体の作製

プラスミド pM1304 16 μ g を 5.5 μ l の 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) / 1 mM エチレンジアミン四酢酸溶液に溶解した。これらに F-12 Nutrient Mixture (Ham) 培地 (GIBCO BRL 社製; 以下、HamF12 培地と略す) を 800 μ l になるよう加え、溶液 A とした。LipofectAMINE 試薬 (GIBCO BRL 社製) 96 μ l に HamF12 培地を 800 μ l になるよう加え、溶液 B とした。溶液 A と溶液 B を混合し、室温で 30 分間インキュベート後、HamF12 培地を 6.4 ml 添加し、DNA-LipofectAMINE 混合液を作製した。前日に、 1.2×10^6 個の CHO DXB11 細胞を 10 cm Φ シャーレ (コーニング社製) に植え込んだものを HamF12 培地で洗浄後、DNA-LipofectAMINE 混合液 8 ml を添加した。5% CO₂ / 95% air 存在下、37 $^{\circ}$ C で 7.5 時間インキュベート後、DNA-LipofectAMINE 混合液を除去し、10% 非働化ウシ胎児血清 (JRH BIOSCIENCES 社製) 含有 HamF12 培地に交換し、さらに 24 時間培養した。再度、10% 非働化ウシ胎児血清含有 HamF12 培地に交換し、24 時間培養後 10^3 、 10^4 、 10^5 個 / 10 ml 10% 非働化ウシ胎児血清含有 HamF12 培地 / 10 cm Φ シャーレになるよう蒔き直した。その 2 日後、10% 非働化透析ウシ胎児血清 (GIBCO BRL 社製) 含有 Minimum Essential Medium Alpha Medium

without ribonucleotides and deoxyri
bonucleotides (GIBCO BRL社製; 以下、MEM α (－)
と略す) 培地に交換し、DHFR遺伝子が導入された細胞の選択を開始した。そ
の後、3または4日毎に10%非働化透析ウシ胎児血清含有MEM α (－) 培地
5 で培地交換すると約2週間目ごろより、DHFR陽性細胞のコロニーが形成され
た。これらから、延原らの方法(実験医学、Vol. 5 No. 11 1987
年、1108-1112頁)に従い、shFas(nd29)-Fc発現/
DHFR陽性細胞をクローニングした。すなわち、約100個の単コロニーを
ペニシリンカップを用いてクローニングし、48穴プレート(NUNC社製)へ
10 継代した。その後、3または4日毎に10%非働化透析ウシ胎児血清含有MEM
 α (－) 培地で培地交換し、コンフルエントになるとスケールアップした。6穴
プレート(NUNC社製)でコンフルエントになる程度まで、細胞が増殖し
たら、細胞数を 2.5×10^5 個/500 μ l 10%非働化透析ウシ胎児血清
含有MEM α (－) 培地/24穴プレート(NUNC社製)にそろえて植
15 え込み、2または3日後に上清を回収した。上清中のshFas(nd29)-
Fc量をEIAで測定し、発現量の高い株(CHO(pM1304)72)を選
択した。

(2) 遺伝子増幅によるshFas(nd29)-Fc高発現株(CHO
(pM1304)72-105-55)の作製

20 延原らの方法(実験医学、Vol. 5 No. 11 1987年、1108-
1112頁)に従いメソトレキセート(MTX)による遺伝子増幅を行い、sh
Fas(nd29)-Fc高発現株を作製した。すなわち、CHO(pM130

- 4) 72細胞を 10^3 、 10^4 、 10^5 個/ 10 ml 10%非働化透析ウシ胎児血清含有MEM α (ー) 培地/ $10\text{ cm}\Phi$ シャーレになるよう植え込み、翌日5 nM MTX (Lederle社製) を含む10%非働化透析ウシ胎児血清含有MEM α (ー) 培地に交換し、遺伝子増幅を開始した。その後、3または4日
- 5 毎に5 nM MTXを含む10%非働化透析ウシ胎児血清含有MEM α (ー) 培地で培地交換すると、約2週間目ごろより5 nM MTX耐性細胞のコロニーが形成された。以降、CHO (pM1304) 72細胞取得と同様の方法で、5 nM MTX耐性株shFas (nd29) -Fc高発現細胞 (CHO (pM1304) 72-105) を得た。その後、同様の操作を繰り返すことで、
- 10 50 nM MTX耐性株shFas (nd29) -Fc高発現細胞 (CHO (pM1304) 72-105-55) を得た。

実施例6. CHO細胞を用いたshFas (nd29) -Fcの生産およびその精製

(1) shFas (nd29) -Fc生産CHO細胞の培養

- 15 実施例5で作製したCHO (pM1304) 72-105-55を培養面積 6000 cm^2 のセルファクトリー (Nunc社製) に増殖培地として50 nM MTX含有IBL Media I ((株) 免疫生物研究所製) を用い、 2.3×10^4 個/ cm^2 となるよう植え込み、5%CO₂ /95%air存在下、37℃で6日間培養した。コンフルエントになったのを確認後、
- 20 培地をIBL Media Iからインシュリンとトランスフェリンを除いた培地(生産培地) に交換した。5%CO₂ /95%air存在下、37℃で4日間培養した後に上清を回収した。上清回収後の細胞に、再び生産培地を加え、さらに

4日間培養し上清を再び回収した。

(2) CHO細胞培養上清からの s h F a s (n d 2 9) - F c の精製

実施例 1 - (2) と同様の方法で上述の培養上清から、プロテイン A クロマトグラフィーを用いて s h F a s (n d 2 9) - F c を精製した。

5 実施例 7. s h F a s (n d 2 9) - F c の毒性試験

s h F a s (n d 2 9) - F c の毒性を調べるために、雄性、6 週齢、B D F 1 マウス (日本チャールスリバー (株) 製) に s h F a s (n d 2 9) - F c を 1 0、3 0 m g / k g の用量で 2 日に 1 回、1 2 日間、計 7 回尾静脈から投与し、その影響を調べた。実験はコントロール群、s h F a s (n d 2 9) - F c 1 0 m g / k g 投与群、s h F a s (n d 2 9) - F c 3 0 m g / k g 投与群の 3 群とし、各群 n = 3 とした。なお、各投与群の投与蛋白質量を同じ 3 0 m g / k g とするために、コントロール群には 3 0 m g / k g のヒト血清アルブミンを、s h F a s (n d 2 9) - F c 1 0 m g / k g 投与群には s h F a s (n d 2 9) - F c 1 0 m g / k g とヒト血清アルブミン 2 0 m g / k g を、s h F a s (n d 2 9) - F c 3 0 m g / k g 投与群には s h F a s (n d 2 9) - F c 3 0 m g / k g を投与した。投与開始日から、2 日に 1 回、体重測定を行った。投与開始 1 4 日目に眼底静脈より採血を行い血球数を測定後、血漿を調製し、G O T、G P T、クレアチニンを測定した。また、採血終了後、剖検を行い、目視による主要臓器 (肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、腸) の変化を調べた。血球数の測定は S y s m e x 社の自動血球測定装置 K - 2 0 0 0 を用いて行った。G O T、G P T、およびクレアチニンはオートアナライザー C O B A S F A R A (ロッシュ社製) を用いて測定した。

その結果、10、30 mg/kgのshFas (nd29) -Fcを2日に1回、12日間、計7回マウスに投与しても体重増加、血球数、肝臓(GOT、GPT)、腎臓(クレアチニン)、その他主要臓器(肉眼的所見)への有意な影響は認められなかった。

5 実施例8. Fasアンタゴニストのエンドトキシン誘発肝障害モデルにおける効果

(1) shFas (nd29) -Fcのマウス肝障害抑制作用

C57BL/6Cr Slcマウス(雄、9週齢、日本エスエルシー株式会社製)を用い、1群5匹、3群を被験動物として用いた。同マウスに1.5 mg/mlの濃度になるように生理食塩水に溶解したプロピオンバクテリウムアクネス(P. acness)加熱死菌(リビウムノケミカルコーポレーション社製)液を尾静脈から0.2 ml投与した。8日後に、実施例1で調製したshFas (nd29) -Fcを希釈液(0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩水)で希釈し、0.3 mg/8 ml/kg、1 mg/8 ml/kgの用量で
10 尾静脈から投与した。対照群には希釈液を投与した。5分後に5 µg/mlの濃度になるように生理食塩水で調製したリポポリサッカライド(シグマ社製)液を0.2 ml腹腔内に投与した。リポポリサッカライド投与8、24時間後に眼底から75 µlを採血した。採血した血液は3.8%クエン酸ナトリウム水溶液8.3 µlと混合後、3000回転、10分間遠心した。遠心後、得られた血
15 漿を液体窒素で凍結後、使用時までマイナス30度で保存した。GOT、GPTの測定はGOT-FAテストワコー(和光純薬工業株式会社製)、GPT-FAテストワコー(和光純薬工業株式会社製)とオートアナライザー(ロッシュ
20

社製、コバスファラ)を用いて測定した。その結果、shFas(nd29)-Fc 1mg/8ml/kg投与群においてGOTおよびGPTの値は対照群のそれよりも低値であり、肝障害抑制効果が認められた。

(2) shFas(nd29)-hingeの Maus 肝障害抑制作用

- 5 C57BL/6CrSlcマウス(雄、9週齢、日本エスエルシー株式会社製)を用い、1群5匹、3群を被験動物として、上記と同様に行った。その結果、shFas(nd29)-hinge投与群のGOTおよびGPTの値は対照群のそれよりも低値であり、肝障害抑制効果が認められた。

実施例9. 抗ヒトFasリガンド抗体の肝障害モデルマウスにおける効果

10 (1) 肝障害モデルマウスの作製

- 雄性、5週齢、BALB/cマウス(日本エスエルシー(株)製)を用いた。同マウスに5.0mg/mlのP.acnes加熱死菌(RIBI IMMUNOCHEM RESEARCH, INC.)含有生理食塩水を尾静脈から0.2ml投与し、10日後にヒトFasリガンド細胞外領域を0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩水で50μg/mlに希釈し、尾静脈から0.2ml投与することで肝障害モデルマウスを作製した。なお、ヒトFasリガンド細胞外領域は、ピキア(Pichia pastoris)酵母用プラスミドpPIC9(Invitrogen社製)に、ヒトFasリガンド細胞外領域をコードするDNAを組み込んだ発現プラスミドで、ピキア酵母GS115株(Invitrogen社製)を形質転換し、得られた形質転換体の培養上清から、80%飽和硫酸アンモニウム沈析、hFas-Fc結合プロテインA-セルロフラインアフィニティーカラム、及びMonoS(ファルマシア社製)カラム等による精
- 15
- 20

製操作により得た（タナカ M. 等、Nature Medicine、2巻、317-322頁、1996年）。また、国際特許出願公開番号WO95/13293の実施例18に記載の方法に従って調製したものも同様に使用できる。

（2）抗ヒトFasリガンド抗体の致死抑制効果

- 5 前述の受託番号FERM BP-5535のハイブリドーマF919-9-18により産生されるマウス抗ヒトFasリガンドモノクローナル抗体F919-9-18を使用した。抗ヒトFasリガンドモノクローナル抗体F919-9-18投与群には、ヒトFasリガンド細胞外領域投与の5分前にF919-9-18を0.4mg/kgあるいは1.2mg/kg尾静脈から投与した。コントロール群には、抗ヒトFasリガンド抗体の希釈液である0.1%ヒト血清アルブミン含有生理食塩水を投与した。各群n=5とした。その結果、コントロール群はFasリガンド細胞外領域投与8時間後までに全例死亡したが、抗ヒトFasリガンド抗体0.4mg/kg投与群の24時間後の生存率は20%、抗ヒトFasリガンド抗体1.2mg/kg投与群の24時間後の生存率100%であった（図16）。
- 10
15

実施例10. 抗マウスFasリガンド抗体の作製および生産、精製

（1）抗マウスFasリガンド抗体の作製

- 可溶型マウスFasリガンドWX2（J. Immunology、157巻、3918-3924頁、1996年）由来のマウスFasリガンド細胞外領域とマウスCD40リガンドの細胞内領域、膜貫通領域および細胞外領域の一部（N末端から78アミノ酸）を融合したキメラ蛋白質をコードする遺伝子をヒトエロ
- 20
- ンゲーションファクター（EF）プロモータの下流に有するプラスミドを作製し

た（ミズシマーナガタ（Mizushima-Nagata）、Nucleic
Acids Research、18巻、5322頁、1990年）。上記プ
ラスミドをWR19L細胞にトランスフェクトし、細胞膜上にマウスFasリガ
ンドを発現している組換え細胞W40LFLを得て、投与抗原として用いた。免
疫動物としてアルメニアハムスターを用いた。フロイント完全アジュバントと混
合した 1×10^7 個のW40LFLをアルメニアハムスターの皮下に投与
し、1ヶ月後にPBSに懸濁した 2×10^7 個のW40LFLを皮下に投与
した。さらに1ヶ月後、PBSに懸濁した 5×10^6 個のW40LFLをフット
パッドに投与した。3日後、リンパ節細胞を取り出し、マウスミエローマ細胞P
3-X63-Ag8-U1（P3-U1）と細胞融合した。HAT培地（ヒポキ
サンチン-アミノプテリン-チミジン）による選択の後、生育したハイブリド
ーマの中から、その培養上清中にマウスFasリガンドによる細胞障害性を中和す
る活性を有するハイブリドーマFLIM4（#4-2）、FLIM23（#23
-2）、FLIM58（#58-11）を得た。

15 (2) FLIM58（#58-11）の生産および精製

ハイブリドーマ#58-11を無血清培地Hybridoma-SFM
（GIBCOBRL社）にて培養し、その培養上清をプロテイン-Aカラム
（PROSEP-A、Bioprocessing社）で精製し、精製抗体
FLIM58（#58-11）を得た。蛋白濃度は280nmの吸光度より算出
した。

実施例 11. マウスおよびラット Fas リガンドに対する抗マウス Fas リガ
ンド抗体 # 58-11 の中和活性

抗マウス Fas リガンド抗体 # 58-11 の中和活性は国際特許出願公開番号
WO 95/13293 の実施例に記載されている方法と同様に、 ^{51}Cr の遊離を
5 指標としたアッセイにより調べた。

(1) エフェクター細胞の調製

雄性、7 週令、ICR マウス（日本チャールスリバー）および、雄性、11 週
令、Wistar ラット（日本チャールスリバー）の脾細胞を実施例 4 の方法と
同様に調製した。得られた脾細胞を 2×10^6 個/ml の濃度に調製し、40 U
10 /ml 組換え型ヒト IL-2（Boehringer Mannheim 社）およ
び 10% 非働化 FBS（JRHBiosciences 社）含有 RPMI
1640 培地（GIBCOBRL 社）にて、5% 炭酸ガス存在下 37℃ で一晚培
養した。100 nM コンカナマイシン A（和光純薬工業）を添加し、1 時間培養
後、10 ng/ml PMA（SIGMA 社）および 500 ng/ml イオノマイ
15 シン（CALBIOCHEM 社）を添加し、さらに 2 時間培養した。細胞を回収
し、10% 非働化 FBS 含有 RPMI 1640 培地にて洗浄後、 2.5×10^7
個/ml となるよう 10% 非働化 FBS 含有 RPMI 1640 培地に懸濁し
た。

(2) ターゲット細胞の調製

20 ターゲット細胞の調製は国際特許出願公開番号 WO 95/13293 に記載さ
れているのと同様の方法でおこなった。すなわち、ターゲットにはマウス Fas
発現細胞 W4 細胞を用い、 10^6 個の W4 細胞を $20 \mu\text{Ci}$ の ^{51}Cr -クロム酸

ナトリウム (NEN社) を含むRPMI 1640培地を用いて37℃で5%炭酸ガス存在下で2時間培養し、 ^{51}Cr 標識した。

(3) 抗マウス Fas リガンド抗体 # 58-11 のマウスおよびラット Fas リガンドに対する中和活性

- 5 上述の活性化マウスあるいはラット脾細胞 1×10^6 個に種々の濃度の抗マウス Fas リガンド抗体 # 58-11 を添加し、5%炭酸ガス存在下で37℃、30分間培養した。次に上述の ^{51}Cr で標識したW4細胞を 1×10^4 個を添加し、800 rpm、2分間の遠心後、5%炭酸ガス存在下37℃で4時間培養した。1200 rpmで5分間遠心して得られた上清中の ^{51}Cr 量を測定
- 10 し、抗マウス Fas リガンド抗体 # 58-11 の効果を調べた。また、上述の活性化マウスおよびラット脾細胞による細胞障害活性が Fas L による細胞障害活性であることを確かめるために、抗マウス Fas リガンド抗体 # 58-11 と同様の方法にて国際特許出願番号 PCT/JP 97/01502 に記載されている Fas 誘導体 sh Fas (nd 29) -Fc を添加し、アッセイの陽性コン
- 15 トロールとして用いた。得られた結果は国際特許出願公開番号 WO 95/13293 に記載されている ^{51}Cr の遊離を指標としたアッセイと同様の方法にて解析した。その結果、陽性コントロールとして用いた sh Fas (nd 29) -Fc は活性化マウスおよびラット脾細胞による細胞障害活性を $0.3 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の間で用量依存的に抑制し、用いた活性化マウスおよびラット脾細胞
- 20 は Fas L 依存的に細胞障害性を示すことが証明された。また、抗マウス Fas リガンド抗体 # 58-11 も sh Fas (nd 29) -Fc と同様に、マウスおよびラットの活性化脾細胞の細胞障害活性を $0.03 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 0.3 \mu\text{g}/$

m l の間で用量依存的に抑制した。すなわち、抗マウス F a s リガンド抗体 # 5 8 - 1 1 はマウスおよびラット F a s リガンドを阻害した。

実施例 1 2 . 抗マウス F a s リガンド抗体 # 5 8 - 1 1 の毒性試験

(1) 方法

- 5 雄性、8 週齢、D B A / 1 J マウスおよび C 3 H / H e マウス（日本チャールスリバー）を用いた。抗マウス F a s リガンド抗体 # 5 8 - 1 1 を 1 0 0 m g / 3 0 m l / k g の用量で尾静脈から投与した。またコントロール群には生理食塩水（大塚製薬）を 3 0 m l / k g の用量で尾静脈から投与した。2 種の系統ともに各群 n = 3 とした。観察期間を 7 日間とし、体重測定、血液学的検査（赤
- 10 血球、白血球、血小板）、血液生化学的検査（G O T、G P T、尿素窒素）、肉眼による剖検を行った。

(2) 結果

- 抗マウス F a s リガンド抗体 # 5 8 - 1 1 投与群の投与後の体重増加、血液学的検査値（赤血球、白血球、血小板）、血液生化学的検査値（G O T、G P T、
- 15 尿素窒素）はコントロール群と比べて差を認めなかった。また、肉眼による剖検所見においても抗マウス F a s リガンド抗体 # 5 8 - 1 1 投与群に異常は認められなかった。

実施例 1 3 . 抗マウス F a s リガンド抗体の心虚血再灌流障害に対する効果

(1) 方法

- 20 実施例 2 と同様の方法でラット心虚血再灌流モデルを作製した。抗マウス F a s リガンド抗体 # 5 8 - 1 1 を 0 . 1 % ヒト血清アルブミン含有生理食塩水にて希釈し、1 m g / 5 m l / k g の用量で、再灌流開始直後にラット右大腿静

脈から投与した。なお、コントロール群には正常ハムスター血清由来精製 I g G 抗体 (C a p p e l 社) を $1 \text{ mg} / 5 \text{ ml} / \text{kg}$ の用量で投与した。# 5 8 - 1 1 投与群 3 例、コントロール群 3 例とした。実施例 2 と同様の方法で各切片中の非虚血領域、虚血領域、壊死領域の測定、および血漿中クレアチンキナーゼ (C P K) 測定を測定した。

(2) 結果

抗マウス F a s リガンド抗体 # 5 8 - 1 1 投与群の虚血領域に対する壊死領域の比率 (%) はコントロール群よりも低かった (図 1 7)。また、抗マウス F a s リガンド抗体 # 5 8 - 1 1 投与群の血漿中 C P K 値はコントロール群よりも低 10 かった (図 1 8)。

実施例 1 4. マウス G V H D モデルにおける抗マウス F a s リガンド抗体の生存率に対する効果

(1) 宿主マウスの骨髄抑制

宿主マウスとして、雄性、6 週齢、D B A / 2 マウス (日本チャールスリバー 15 (株)) を用いた。宿主マウスの腹腔内に $3 5 0 \text{ mg} / \text{kg}$ のシクロホスファミド (塩野義製薬 (株)、エンドキサン) を投与し骨髄抑制を誘導した。

(2) 供与マウス由来脾臓リンパ球の調製および宿主マウスへの移植

供与マウスとして雄性、7 ~ 8 週齢、B 1 0 . D 2 マウス (日本エスエルシー (株)) を用いた。供与マウスの脾臓をハンクス液 (日水製薬 (株)) 中でピン 20 セットを用いてほぐした後、遠心し、得られた細胞を $0 . 0 1 7 \text{ M}$ トリス - $0 . 7 4 7 \%$ 塩化アンモニウム溶液中に懸濁し赤血球のみを溶血させた。残った細胞をハンクス液で洗浄したものを供与マウス由来脾臓リンパ球とし、前述のシ

クロホスファミド投与1日後の宿主マウスに 3×10^7 個/マウス尾静脈から移植した。

(3) 抗マウス Fas リガンド抗体 # 58-11 の効果検討

- 供与マウス由来脾臓リンパ球移植の30分前に、 $10 \text{ mg} / 10 \text{ ml} / \text{kg}$ の
- 5 抗マウス Fas リガンド抗体 # 58-11 あるいは正常ハムスター血清由来精製 IgG (Cappel 社) を尾静脈から投与し、生存率を調べた。なお、上記抗体の代わりに抗体希釈液である生理食塩水 (大塚製薬) $10 \text{ ml} / \text{kg}$ を、供与マウス由来脾臓リンパ球の代わりに細胞懸濁液であるハンス液を投与したマウスを GVHD 陰性群とした (各群とも $n = 8$)。その結果、脾細胞移植8日後に
- 10 おける生存率は、GVHD 陰性群 63%、抗マウス Fas リガンド抗体 # 58-11 投与群 63%、コントロール抗体投与群 38% であった。コントロール抗体投与群の生存率との比較から、抗マウス Fas リガンド抗体 # 58-11 投与群に GVHD における生存率改善効果が認められた (図 19)。

実施例 15. 抗マウス Fas リガンド抗体の腎虚血再灌流モデルにおける効果

15 (1) 腎虚血再灌流モデルの作製

- 雄性、6週令、ICR系マウス (日本エスエルシー (株)) をペントバルビタール麻酔下で手術台上に仰臥位に固定し、腹部を切開した。開腹部より右側腎臓を摘出した後、左側腎動静脈をクリップ (VASCULAR CLIP AS-1、協和時計工業) を用いて遮断し、虚血状態とした。30分後クリップをはずし血液を再灌流した。血液再灌流の24時間後、腹部大静脈より採血し、血漿中クレアチニン、および尿素窒素を測定した。クレアチニンの測定は
- 20 デタミナ CRE 55 s (協和メディックス) を、尿素窒素の測定は尿素窒素 B テ

ストワコー（和光純薬工業（株））を用いてオートアナライザー（COBAS FARA、ロッシュ）により測定した。

（２）抗マウス Fas リガンド抗体 # 58-11 の投与

抗マウス Fas リガンド抗体 # 58-11 を 0.1% BSA (SIGMA) 含有生理食塩水にて希釈し、0.3 mg / 1.0 ml / kg あるいは 3 mg / 1.0 ml / kg の用量で左側腎動静脈虚血直前および再灌流直後に静脈内投与した。なお、コントロール群は 0.1% BSA 含有生理食塩水を投与した。偽手術群は右腎摘出した後、虚血状態とせずに 0.1% BSA 含有生理食塩水を投与した。各群 8 例ずつとした。

10 （３）結果

抗マウス Fas リガンド抗体 # 58-11 3 mg / kg 投与群の血漿クレアチニン値、尿素窒素値はコントロール群より低値であり、腎虚血再灌流障害の抑制効果が認められた（図 20 および 21）。以上の結果は、本願発明の疾患予防・治療剤または臓器保存剤が疾患に優れた効果を有することを示すものである。また、本発明の疾患予防・治療剤は、著しい毒性を示さず、少なくとも Fas / Fas リガンド系の生物作用を抑制することによる毒性は認められない。従って、本発明の Fas アンタゴニストを有効成分とする疾患予防・治療剤は、Fas によるシグナルの発生又は伝達を遮断し、Fas / Fas リガンド系の生物作用、特に Fas を介した細胞の死、特にアポトーシスが抑制される限り、これが関与する疾患の治療に有効である。

15

20

産業上の利用可能性

本発明の Fas アンタゴニストを有効成分とする疾患の予防・治療剤は Fas / Fas リガンド系の生物作用、特に、 Fas を介する細胞の死、特に、アポトーシスを抑制し、疾患の予防又は治療効果を有する。又、著しい毒性を示さ
5 ず、少なくとも Fas / Fas リガンド系の生物作用を抑制することによる毒性は認められない。したがって、本発明の Fas アンタゴニストは、細胞の死、特に、アポトーシスが関与する疾患の予防・治療剤として期待される。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 3 8 1

5 配列の型 : 核酸

配列の種類 : c D N A t o m R N A

配列 :

ATGATGTCCT CTGCTCAGTT CCTTGGTCTC CTGTTGCTCT GTTTTCAAGG TACCAGATGT 60
GATATCCAGA TGACACAGAC TACATCCTCC CTGTCTGCCT CTCTGGGAGA CAGAGTCACC 120
10 ATCAGTTGCA GGGCCAGTCA GGACATTAGC AATTATTTAA ACTGGTATCA GCAGAAACCA 180
GATGGAAGCTG TTAAACTCCT GATCTACTAC ACATCAAGAT TACTCTCAGG AGTCCCATCA 240
AGGTTCACTG GCAGTGGGTC TGGGACAAAT TATTCTCTCA CCATTAGCAA CCTGGAACAA 300
GGAGATATTG CCACTTACTT TTGCCAACAG GGTAGTACGC TTCCGTGGAC GTTCGGTGGG 360
GGCACCAAGC TGGAAATCAA A 381

15

配列番号 : 2

配列の長さ : 4 0 8

配列の型 : 核酸

配列の種類 : c D N A t o m R N A

20 配列 :

ATGGATTGGG TGTGGACCTT GCTATTCCTG ATAGCAGCTG CCCAAAGTGC CCAAGCACAG 60
ATCCAGTTGG TGCAGTCTGG ACCTGAGCTG AAGAAGCCTG GAGAGACAGT CAAGATCTCC 120

TGCAAGGCTT CTGGGTATAC CTTACAGAA TATCCAATGC ACTGGGTGAA GCAGGCTCCA 180
GGAAAGGGTT TCAAGTGGAT GGGCATGATA TACACCGACA CTGGAGAGCC ATCATATGCT 240
GAAGAGTTCA AGGGGCGGTT TGCCTTCTCT TTGGAGACCT CTGCCAGCAC TGCCTATTTG 300
CAGATCAACT TCCTCAAAAA TGAGGACACG GCTACATATT TCTGTGTAAG ATTTTACTGG 360
5 GATTACTTTG ACTACTGGGG CCAAGGCACC ACTCTCACAG TCTCCTCA 408

配列番号 : 3

配列の長さ : 3 8 1

配列の型 : 核酸

10 配列の種類 : c D N A t o m R N A

配列 :

ATGGAGACCG ATACCCTCCT GCTATGGGTC CTCCTGCTAT GGGTCCCAGG ATCAACCGGA 60
GATATTCAGA TGACCCAGAG TCCGTCGACC CTCTCTGCTA GCGTCGGGGA TAGGGTCACC 120
ATAACTTGCA GGGCAAGTCA GGACATTTTCG AATTATTTAA ACTGGTATCA GCAGAAGCCA 180
15 GGCAAAGCTC CCAAGCTTCT AATTTATTAC ACATCAAGAT TACACTCAGG GGTACCTTCA 240
CGCTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACCAAT TATACCCTCA CAATCTCGAG TCTGCAGCCA 300
GATGATTTTCG CCACTTATTT TTGCCAACAG GGTAGTACGC TTCCGTGGAC GTTCGGTCAG 360
GGGACCAAGG TGGAGGTCAA A 381

20 配列番号 : 4

配列の長さ : 4 0 8

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

ATGGATTGGG TGTGGACCTT GCTATTCCTG ATAGCTGCAG CCCAAAGTGC CCAAGCACAG 60
GTCCAGTTGG TGCAGTCTGG AGCTGAGGTG AAGAAGCCTG GAAGCTCAGT CAAGGTGTCC 120
5 TGCAAAGCTT CTGGGTATAC CTTACAGAA TATCCAATGC ACTGGGTGAG ACAGGCTCCA 180
GGACAGGGTT TCAAGTGGAT GGGCATGATA TACACCGACA CTGGAGAGCC ATCATATGCT 240
GAAGAGTTCA AGGGACGGTT TACATTCACT TTGGACACCT CTACCAACAC TGCCTATATG 300
GAGCTCAGCT CTCTCAGGTC TGAGGACACG GCTGTCTATT ACTGTGTAAG ATTTTACTGG 360
GATTACTTTG ACTACTGGGG TCAAGGTACC CTGGTCACAG TCTCCTCA 408

10

配列番号 : 5

配列の長さ : 1 1 8 2

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA

15 配列 :

TTTTCTTCCA TTTCAGGTGT CGTGAGGAAT TCACCATGCT GGGCATCTGG ACCCTCCTAC 60
CTCTGGTTCT GACTAGTGTC GCTACTCAGA ACTTGGAAGG CCTGCATCAT GATGGCCAAT 120
TCTGCCATAA GCCCTGTCCT CCAGGTGAAA GGAAAGCTAG GGAAGTGCACA GTCAATGGGG 180
ATGAACCAGA CTGCGTGCCC TGCCAAGAAG GGAAGGAGTA CACAGACAAA GCCCATTTTT 240
20 CTTCCAAATG CAGAAGATGT AGATTGTGTG ATGAAGGACA TGGCTTAGAA GTGGAATATA 300
ACTGCACCCG GACCCAGAAT ACCAAGTGCA GATGTAAACC AAACCTTTTTT TGTAAGTCTA 360
CTGTATGTGA AACTGTGAC CCTTGCACCA AATGTGAACA TGGAATCATC AAGGAATGCA 420

CACTCACCAG CAACACCAAG TGCAAAGAGG AAGGATCCAG ATCTAACGAG CCCAAATCTT 480
GTGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCACCTGA ACTCCTGGGG GGACCGTCAG 540
TCTTCCTCTT CCCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTCA 600
CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC TGGTACGTGG 660
5 ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC AACAGCACGT 720
ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC AAGGAGTACA 780
AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA 840
AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAT GAGCTGACCA 900
AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC ATCGCCGTGG 960
10 AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC GTGCTGGACT 1020
CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGCAGG 1080
GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC ACGCAGAAGA 1140
GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAATGATAGG GTACCTTCTG AG 1182

15 配列番号 : 6

配列の長さ : 5 3 1

配列の型 : 核酸

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列 :

20 TTTTCTTCCA TTTCAGGTGT CGTGAGGAAT TCACCATGCT GGGCATCTGG ACCCTCCTAC 60
CTCTGCTTCT GACTAGTGTC GCTACTCAGA ACTTGGAAGG CCTGCATCAT GATGGCCAAT 120
TCTGCCATAA GCCCTGTCCT CCAGGTGAAA GGAAAGCTAG GGACTGCACA GTCAATGGGG 180

ATGAACCAGA CTGCGTGCCC TGCCAAGAAG GGAAGGAGTA CACAGACAAA GCCCATTTTT 240
CTTCCAAATG CAGAAGATGT AGATTGTGTG ATGAAGGACA TGCCTTAGAA GTGGAAATAA 300
ACTGCACCCG GACCCAGAAT ACCAAGTGCA GATGTAAACC AAACTTTTTT TGTA ACTCTA 360
CTGTATGTGA AACTGTGAC CCTTGACCA AATGTGAACA TGAATCATC AAGGAATGCA 420
5 CACTCACCAG CAACACCAAG TGCAAAGAGG AAGGATCCAG ATCTAACGAG CCCAAATCTT 480
GTGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CATAGTGAGG TACCTTCTGA G 531

請求の範囲

1. F a s アンタゴニストを有効成分とする疾患の予防・治療剤。
2. 前記疾患がF a s の関与する疾患であることを特徴とする請求の範囲第 1 項に記載の予防・治療剤。
- 5 3. 前記疾患がF a s を介するアポトーシスの関与する疾患であることを特徴とする請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載の予防・治療剤。
4. 前記疾患が心疾患であることを特徴とする請求の範囲第 1 項～第 3 項のいずれかに記載の予防・治療剤。
5. 前記心疾患が心筋梗塞、心不全、または心虚血再灌流障害もしくはそれに基づく疾患であることを特徴とする請求の範囲第 4 項に記載の心疾患予防・治療剤。
- 10 6. 前記疾患が腎疾患であることを特徴とする請求の範囲第 1 項～第 3 項のいずれかに記載の予防・治療剤。
7. 前記腎疾患が腎不全、腎虚血、または腎虚血再灌流障害もしくはそれに基づく疾患であることを特徴とする請求の範囲第 6 項に記載の腎疾患予防・治療剤。
- 15 8. 前記腎疾患が急性腎不全であることを特徴とする請求の範囲第 6 項に記載の腎疾患予防・治療剤。
9. 前記疾患が移植片対宿主病（GVHD）であることを特徴とする請求の範囲第 1 項～第 3 項のいずれかに記載の予防・治療剤。
- 20 10. 前記疾患が虚血再灌流障害又はそれに基づく疾患であることを特徴とする請求の範囲第 1 項～第 3 項のいずれかに記載の予防・治療剤。

1 1. 前記疾患が、心臓、腎臓、または肝臓の虚血再灌流障害もしくはそれに基づく疾患であることを特徴とする請求の範囲第 1 0 項に記載の予防・治療剤。

1 2. 前記疾患が、外科手術または移植に伴う虚血再灌流障害、あるいは血栓溶解療法もしくは血管再建術後の虚血再灌流障害またはそれに基づく疾患であることを特徴とする請求の範囲第 1 0 項に記載の予防・治療剤。

1 3. 前記疾患がエンドトキシンによる臓器の障害、エンドトキシン血症、敗血症、またはそれらに基づく疾患であることを特徴とする請求の範囲第 1 項～第 3 項のいずれかに記載の予防・治療剤。

1 4. 前記臓器が、肝臓であることを特徴とする請求の範囲第 1 3 項に記載の予防・治療剤。

1 5. F a s アンタゴニストを有効成分として含有することを特徴とする臓器保存剤。

1 6. 前記 F a s アンタゴニストが F a s 誘導体、抗 F a s リガンド抗体、または抗 F a s 抗体であることを特徴とする請求の範囲第 1 項～第 1 5 項のいずれかに記載の予防・治療剤又は臓器保存剤。

1 7. 前記抗 F a s リガンド抗体がヒト化抗 F a s リガンド抗体であることを特徴とする請求の範囲第 1 6 項に記載の疾患予防・治療剤又は臓器保存剤。

F I G. 1

30
 ATG ATG TCC TCT GCT CAG TTC CTT GGT CTC CTG TTG CTC TGT TTT CAA GGT ACC AGA TGT
 M S S A Q F L G L L L L C F Q G T R C

60
 90
 GAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT ACA TCC TCC CTG TCT GCC TCT CTG GGA GAC AGA GTC ACC
 D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T

120
 150
 180
 ATC AGT TGC AGG GCC AGT CAG GAC ATT AGC AAT TAT TTA AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA
 I S C R A S O D I S N Y L N W Y Q Q K P

210
 240
 GAT GGA ACT GTT AAA CTC CTG ATC TAC ACA TCA AGA TTA CAC TCA GGA GTC CCA TCA
 D G T V K L L I Y Y T S R L H S G V P S

270
 300
 AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA AAT TAT TCT CTC ACC ATT AGC AAC CTG GAA CAA
 R F S G S G T N Y S L T I S N L E Q

330
 360
 GGA GAT ATT GCC ACT TAC TTT TGC CAA CAG GGT AGT ACG CTT CCG TGG ACG TTC GGT GGA
 G D I A T Y F C O O G S T L P W T F G G

GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA
 G T K L E I K

F I G . 2

30
 ATG GAT TGG GTG TGG ACC TTG CTA TTC CTG ATA GCA GCT GCC CAA AGT GCC CAA GCA CAG
 M D W V W T L L F L I A A A Q S A Q A Q

60
 90
 ATC CAG TTG GTG CAG TCT GGA CCT GAG CTG AAG AAG CCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC TCC
 I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I S

120
 150
 TGC AAG GCT TCT GGG TAT ACC TTC ACA GAA TAT CCA ATG CAC TGG GTG AAG CAG GCT CCA
 C K A S G Y T F T E Y P M H W V K Q A P

180
 210
 GGA AAG GGT TTC AAG TGG ATG GGC ATG ATA TAC ACC GAC ACT GGA GAG CCA TCA TAT GCT
 G K G F K W M G M I Y T D T G E P S Y A

240
 270
 GAA GAG TTC AAG GGG CGG TTT GCC TTC TCT TTG GAG ACC TCT GCC AGC ACT GCC TAT TTG
 E E F K G R F A F S L E T S A S T A Y L

300
 330
 CAG ATC AAC TTC CTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACA TAT TTC TGT GTA AGA TTT TAC TGG
 Q I N F L K N E D T A T Y F C V R F Y W

360
 390
 GAT TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC ACC ACT CTC ACA GTC TCC TCA
 D Y F D Y W G Q G T T L T V S S

30
 ATG GAG ACC GAT ACC CTC CTG CTA TGG GTC CTC CTG CTA TGG GTC CCA GGA TCA ACC GGA
 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G 60

90
 GAT ATT CAG ATG ACC CAG AGT CCG TCG ACC CTC TCT GCT AGC GTC GGG GAT AGG GTC ACC
 D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T 120

150
 ATA ACT TGC AGG GCA AGT CAG GAC ATT TCG AAT TAT TTA AAC TGG TAT CAG CAG AAG CCA
 I T C R A S O D I S N Y L N W Y Q Q K P 180

210
 GGC AAA GCT CCC AAG CTT CTA ATT TAT TAC ACA TCA AGA TTA CAC TCA GGG GTA CCT TCA
 G K A P K L L I Y Y T S R L H S G V P S 240

270
 CGC TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACC AAT TAT ACC CTC ACA ATC TCG AGT CTG CAG CCA
 R F S G S G T N Y T L T I S S L Q P 300

330
 GAT GAT TTC GCC ACT TAT TTT TGC CAA CAG GGT AGT ACG CTT CCG TGG ACG TTC GGT CAG
 D D F A T Y F C O O G S T L P W T F G Q 360

GGG ACC AAG GTG GAG GTC AAA
 G T K V E V K

H I Q . 3

F I Q . 4

30
 ATG GAT TGG GTG TGG ACC TTG CTA TTC CTG ATA GCT GCA GCC CAA AGT GCC CAA GCA CAG
 M D W V W T L L F L I A A A Q S A Q A Q

90
 GTCC CAG TTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGA AGC TCA GTC AAG GTG TCC
 V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S

150
 TGC AAA GCT TCT GGG TAT ACC TTC ACA GAA TAT CCA ATG CAC TGG GTG AGA CAG GCT CCA
 C K A S G Y T F T E Y P M H W V R Q A P

210
 GGA CAG GGT TTC AAG TGG ATG GGC ATG ATA TAC ACC GAC ACT GGA GAG CCA TCA TAT GCT
 G Q G F K W M G M I Y T D T G E P S Y A

270
 GAA GAG TTC AAG GGA CGG TTT ACA TTC ACT TTG GAC ACC TCT ACC AAC ACT GCC TAT ATG
 E E F K G R F T F T L D T S T N T A Y M

330
 GAG CTC AGC TCT CTC AGG TCT GAG GAC ACG GCT GTC TAT TAC TGT GTA AGA TTT TAC TGG
 E L S S L R S E D T A V Y Y C V R F Y W

390
 GAT TAC TTT GAC TAC TGG GGT CAA GGT ACC CTG GTC ACA GTC TCC TCA
 D Y F D Y W G Q G T L V T V S S

F I G. 5

ttttcttccatttcaggtgtcgtgaggaattcacc
50

ATG	CTG	GGC	ATC	TGG	ACC	CTC	CTA	CCT	CTG
Met	Leu	Gly	Ile	Trp	Thr	Leu	Leu	Pro	Leu

-10

hFas antigen signal peptide

GTT	CTG	ACT	AGT	GTC	GCT	ACT	CAG	AAC	TTG
Val	Leu	Thr	Ser	Val	Ala	Thr	Gln	Asn	Leu

-1

1

100

→ hFas (nd29)

GAA	GGC	CTG	CAT	CAT	GAT	GGC	CAA	TTC	TGC
Glu	Gly	Leu	His	His	Asp	Gly	Gln	Phe	Cys

150

CAT	AAG	CCC	TGT	CCT	CCA	GGT	GAA	AGG	AAA
His	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Gly	Glu	Arg	Lys

GCT	AGG	GAC	TGC	ACA	GTC	AAT	GGG	GAT	GAA
Ala	Arg	Asp	Cys	Thr	Val	Asn	Gly	Asp	Glu

200

CCA	GAC	TGC	GTG	CCC	TGC	CAA	GAA	GGG	AAG
Pro	Asp	Cys	Val	Pro	Cys	Gln	Glu	Gly	Lys

GAG	TAC	ACA	GAC	AAA	GCC	CAT	TTT	TCT	TCC
Glu	Tyr	Thr	Asp	Lys	Ala	His	Phe	Ser	Ser

50

250

AAA	TGC	AGA	AGA	TGT	AGA	TTG	TGT	GAT	GAA
Lys	Cys	Arg	Arg	Cys	Arg	Leu	Cys	Asp	Glu

F I G . 6

300
GGA CAT GGC TTA GAA GTG GAA ATA AAC TGC
Gly His Gly Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys
*

ACC CGG ACC CAG AAT ACC AAG TGC AGA TGT
Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg Cys

350
AAA CCA AAC TTT TTT TGT AAC TCT ACT GTA
Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val
*

TGT GAA CAC TGT GAC CCT TGC ACC AAA TGT
Cys Glu His Cys Asp Pro Cys Thr Lys Cys
100

400
GAA CAT GGA ATC ATC AAG GAA TGC ACA CTC
Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu

450
ACC AGC AAC ACC AAG TGC AAA GAG GAA GGA
Thr Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly

TCC AGA TCT AAC GAG CCC AAA TCT TGT GAC
Ser Arg Ser Asn Glu Pro Lys Ser Cys Asp
└─→ hIgG1 Fc
500

AAA ACT CAC ACA TGC CCA CCG TGC CCA GCA
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

F I G . 7

CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
150

550

CTC TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

600

ATG ATC TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACA TGC
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro

650

GAG GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
200

700

CGG GAG GAG CAG TAC AAC AGC ACG TAC CGT
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

*

750

GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

F I G . 8

GAC TGG CTG AAT GGC AAG GAG TAC AAG TGC
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys

800

AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
250

850

CAG CCC CGA GAA CCA CAG GTG TAC ACC CTG
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

900

CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn

CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly

950

TTC TAT CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
300

F I G . 9

1000

AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp

1050

GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AAG CTC ACC
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr

GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

1100

GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala

CTG CAC AAC CAC TAC ACG CAG AAG AGC CTC
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
350

1150

TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA TAG ggtacc
Ser Leu Ser Pro Gly Lys *** ***

ttctgag

F I G . 1 0

ttttcttccatttcaggtgtcgtgaggaattcacc

50

ATG	CTG	GGC	ATC	TGG	ACC	CTC	CTA	CCT	CTG
Met	Leu	Gly	Ile	Trp	Thr	Leu	Leu	Pro	Leu

-10

hFas antigen signal peptide

GTT	CTG	ACT	AGT	GTC	GCT	ACT	CAG	AAC	TTG
Val	Leu	Thr	Ser	Val	Ala	Thr	Gln	Asn	Leu

-1

1

→ hFas (nd29)

100

GAA GGC CTG CAT CAT GAT GGC CAA TTC TGC
Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys

150

CAT AAG CCC TGT CCT CCA GGT GAA AGG AAA
His Lys Pro Cys Pro Pro Gly Glu Arg Lys

GCT AGG GAC TGC ACA GTC AAT GGG GAT GAA
Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu

200

CCA GAC TGC GTG CCC TGC CAA GAA GGG AAG
Pro Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys

GAG TAC ACA GAC AAA GCC CAT TTT TCT TCC
Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His Phe Ser Ser

50

250

AAA TGC AGA AGA TGT AGA TTG TGT GAT GAA
Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu

F I G . 1 1

300

GGA	CAT	GGC	TTA	GAA	GTG	GAA	ATA	AAC	TGC
Gly	His	Gly	Leu	Glu	Val	Glu	Ile	Asn	Cys
								*	

ACC	CGG	ACC	CAG	AAT	ACC	AAG	TGC	AGA	TGT
Thr	Arg	Thr	Gln	Asn	Thr	Lys	Cys	Arg	Cys

350

AAA	CCA	AAC	TTT	TTT	TGT	AAC	TCT	ACT	GTA
Lys	Pro	Asn	Phe	Phe	Cys	Asn	Ser	Thr	Val
						*			

TGT	GAA	CAC	TGT	GAC	CCT	TGC	ACC	AAA	TGT
Cys	Glu	His	Cys	Asp	Pro	Cys	Thr	Lys	Cys
					100				

400

GAA	CAT	GGA	ATC	ATC	AAG	GAA	TGC	ACA	CTC
Glu	His	Gly	Ile	Ile	Lys	Glu	Cys	Thr	Leu

450

ACC	AGC	AAC	ACC	AAG	TGC	AAA	GAG	GAA	GGA
Thr	Ser	Asn	Thr	Lys	Cys	Lys	Glu	Glu	Gly

TCC	AGA	TCT	AAC	GAG	CCC	AAA	TCT	TGT	GAC
Ser	Arg	Ser	Asn	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
				└─→	hIgG1 hinge				

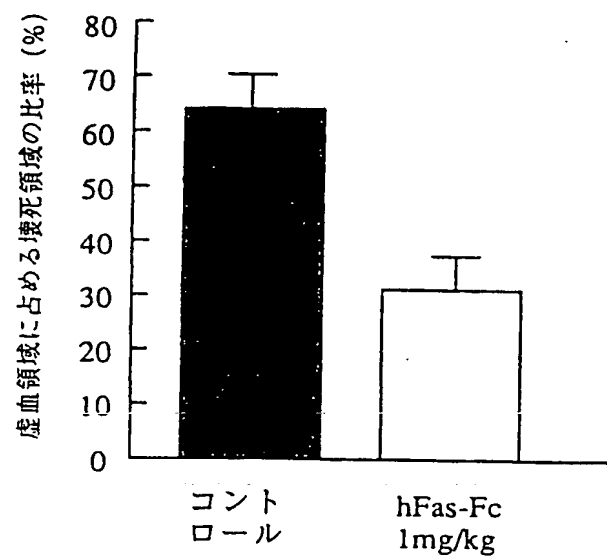
500

AAA	ACT	CAC	ACA	TGC	CCA	CCG	TGC	CCA	TAG
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	***

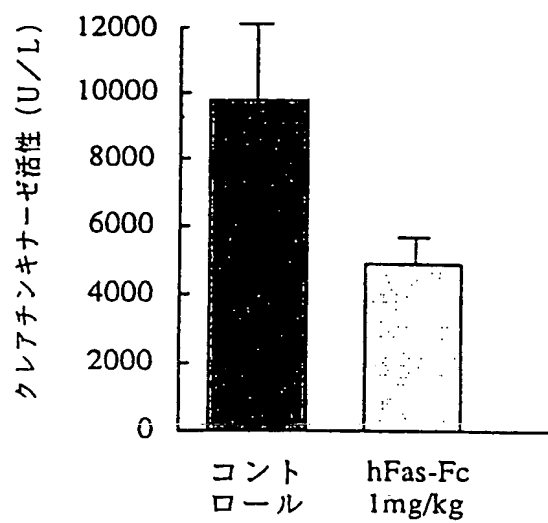
F I G . 1 2

TGA ggtaccttctgag

F I G . 1 3



F I G . 1 4



F I G . 1 5

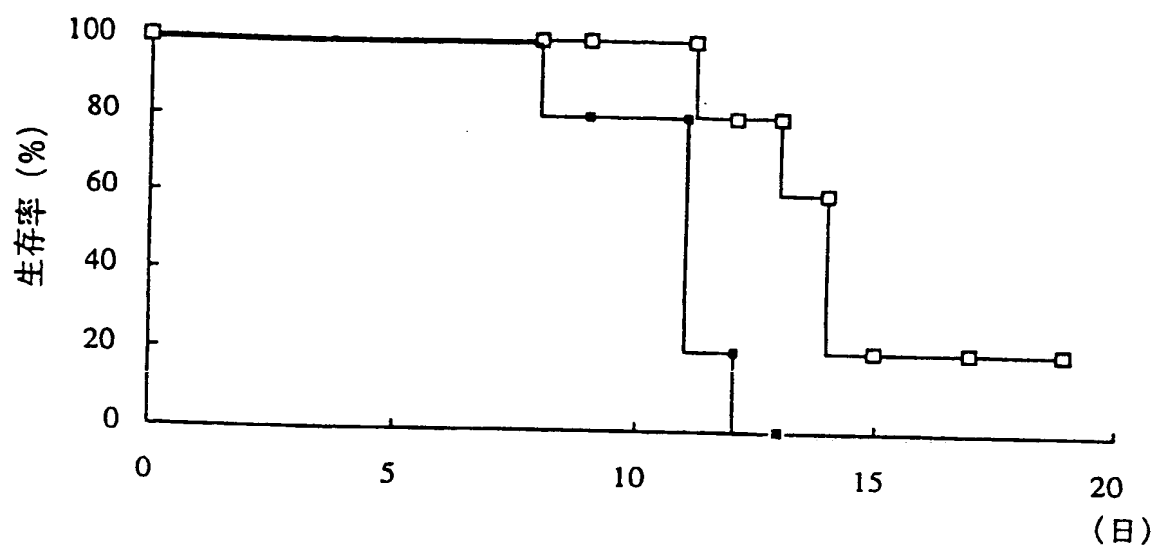
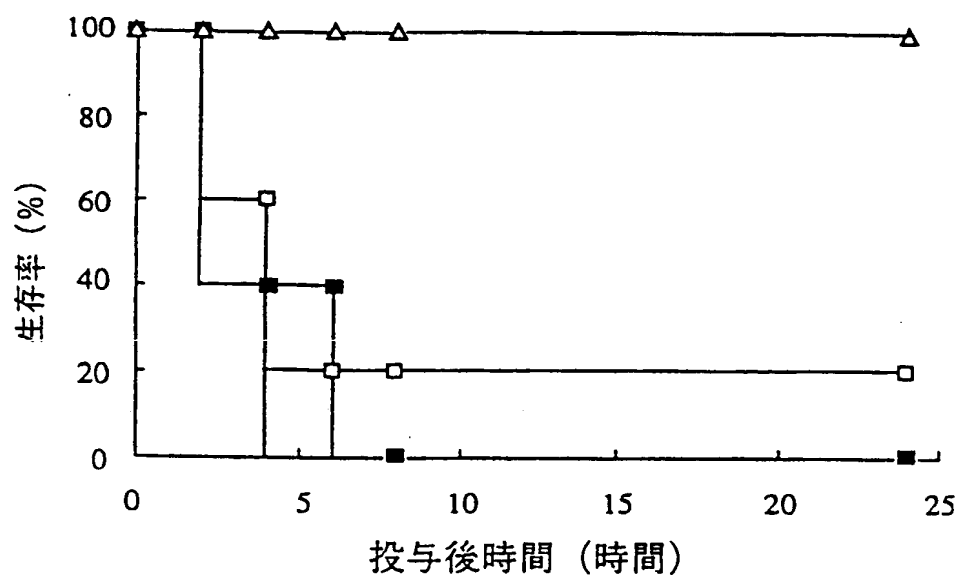
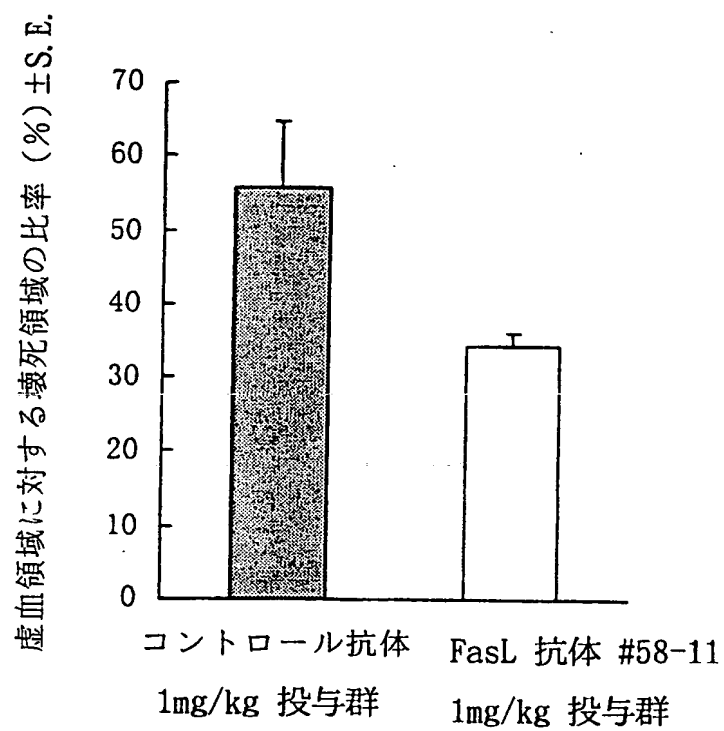


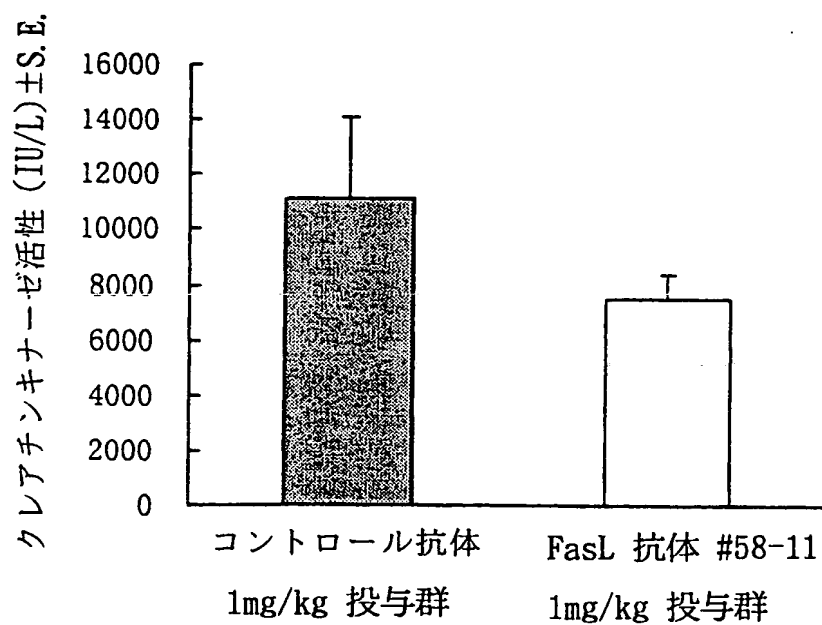
FIG. 16



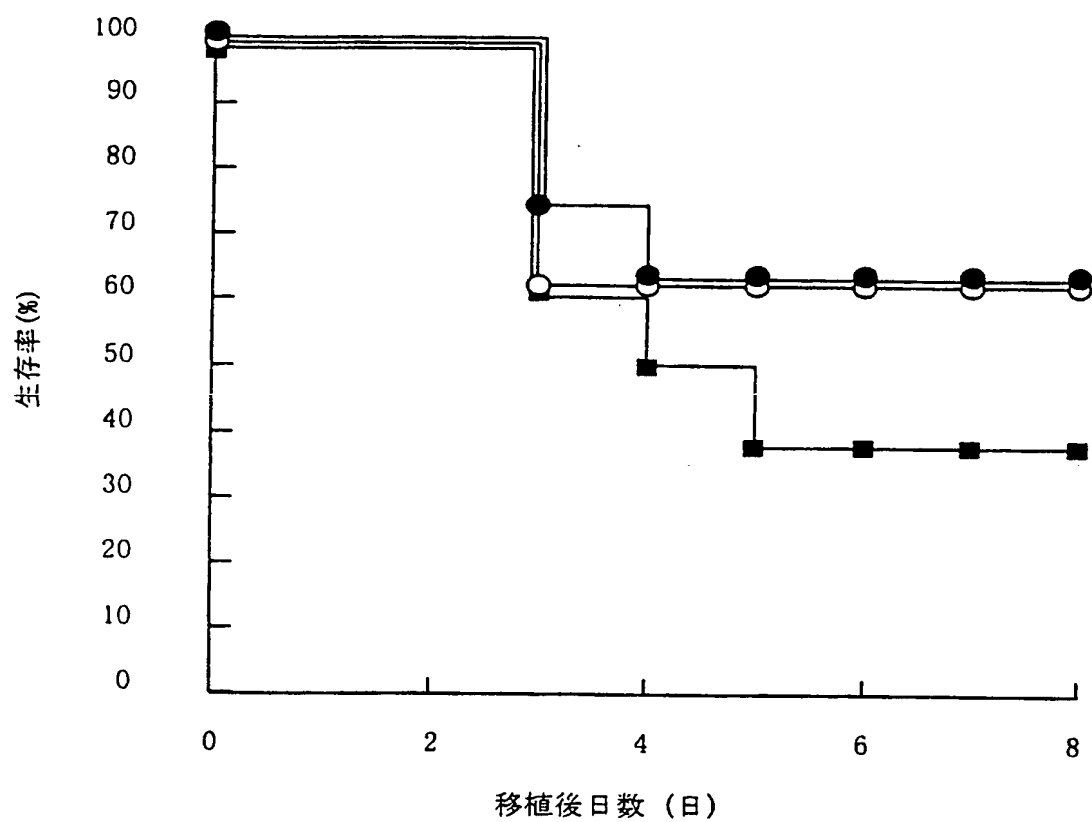
F I G. 1 7



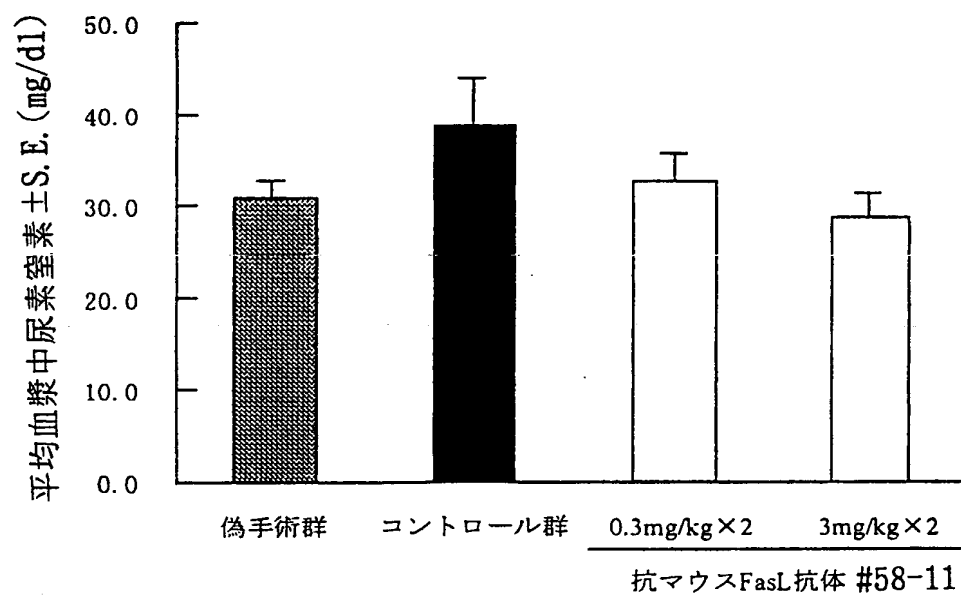
F I G. 1 8



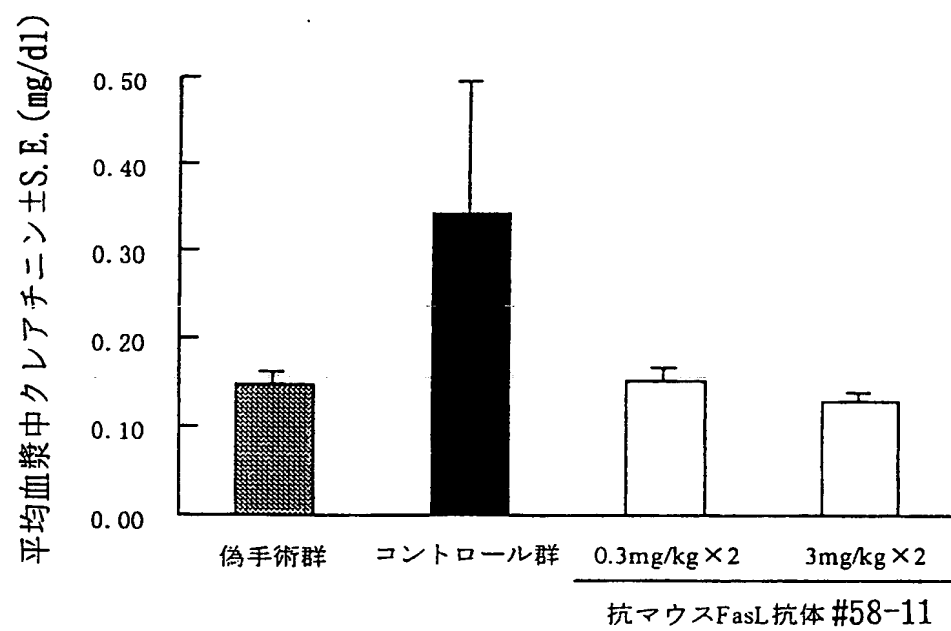
F I G . 1 9



F I G . 2 0



F I G. 2 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03978

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ A61K39/395, A61K38/18, A61K45/00, A01N1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ A61K39/395, A61K38/18, A61K45/00, A01N1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOTECHABS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/ A	GALLE, Peter R., et al., 'Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) Receptor and Ligand in Liver Damage.' J. Exp. Med., 1995, Vol. 182, No. 5, pages 1223 to 1230, especially ABSTRACT of page 1223	1-3, 15-17/ 4 - 14
X/ A	JP, 8-208515, A (Santen Pharmaceutical Co., Ltd.), August 13, 1996 (13. 08. 96), Particularly Abstract & EP, 709097, A1	1 - 3/ 4 - 17
X/ A	WO, 9510540, A1 (Immunex Corp.), April 20, 1995 (20. 04. 95), Particularly page 15, lines 21 to 35 & JP, 9-503672, A	1-3, 15-17/ 4 - 14
P,X/ P,A	JP, 9-110722, A (Toray Industries, Inc.), April 28, 1997 (28. 04. 97), Particularly page 6 (Family: none)	1 - 3/ 4 - 17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 23, 1998 (23. 01. 98)

Date of mailing of the international search report

February 3, 1998 (03. 02. 98)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/03978

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X/ P,A	JP, 9-124509, A (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), May 13, 1997 (13. 05. 97), Particularly Abstract (Family: none)	1 - 3/ 4 - 17
P,X/ P,A	WO, 97/33617, A1 (Protein Design Labs, Inc.), September 18, 1997 (18. 09. 97), Particularly Abstract (Family: none)	1 - 3/ 4 - 17
P,X/ P,A	WO, 97/12632, A1 (TKB Associates Limited Partnership), April 10, 1997 (10. 04. 97), Particularly Abstract (Family: none)	1 - 3/ 4 - 17
P,X/ P,A	WO, 96/40041, A1 (Chiron Corp.), December 19, 1996 (19. 12. 96), Particularly Abstract (Family: none)	1 - 3/ 4 - 17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ A61K39/395, A61K38/18, A61K45/00, A01N1/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl⁶ A61K39/395, A61K38/18, A61K45/00, A01N1/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOTECHABS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/ A	GALLE, Peter R., et al., 'Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) Receptor and Ligand in Liver Damage.' J. Exp. Med., 1995, Vol. 182, No. 5, pages 1223 to 1230, especially ABSTRACT of page 1223	1-3, 15-17/ 4-14
X/ A	JP, 8-208515, A (参天製薬株式会社) 13. 8月. 1996 (13. 08. 96), 特に、要約 & EP, 709097, A1	1-3/ 4-17
X/ A	WO, 9510540, A1 (IMMUNEX CORPORATION) 20. 04. 95, 特に、第15頁第21~35行 & JP, 9-503672, A	1-3, 15-17/ 4-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 01. 98

国際調査報告の発送日

03.02.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

弘 實 謙 二 印

4C

9455

電話番号 03-3581-1101 内線 3454

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X/ P, A	JP, 9-110722, A (東レ株式会社) 28. 4月. 1997 (28. 04. 97), 特に、第6頁 (ファミリーなし)	1-3/ 4-17
P, X/ P, A	JP, 9-124509, A (住友電気工業株式会社) 13. 5月. 1997 (13. 05. 97), 特に、要約 (ファミリーなし)	1-3/ 4-17
P, X/ P, A	WO, 97/33617, A1 (PROTEIN DESIGN LABS, INC.) 18. 09. 97, 特に、要約 (ファミリーなし)	1-3/ 4-17
P, X/ P, A	WO, 97/12632, A1 (TKB ASSOCIATES LIMITED PARTNERSHIP) 10. 04. 97, 特に、要約 (ファミリーなし)	1-3/ 4-17
P, X/ P, A	WO, 96/40041, A1 (CHIRON CORPORATION) 19. 12. 96, 特に、要約 (ファミリーなし)	1-3/ 4-17